

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Barbara Nikolić

Polimorfizam gena za serotonininski receptor 5-HT₆ i demencija

Diplomski rad

Zagreb, 2016. godina

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju, na Zavodu za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dubravke Švob Štrac, znanstvene suradnice IRB-a. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Zahvale

Ovim putem od srca želim zahvaliti svima koji su mi pružili podršku u izradi ovoga rada, a posebno voditeljici Dr.sc. Dubravki Švob Štrac i suvoditeljici Izv.prof.dr.sc. Dubravki Hranilović na susretljivosti i strpljenju! Veliko hvala i mojim roditeljima i prijateljima koji su bili uvijek uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Polimorfizam gena za serotonininski receptor 5-HT₆ i demencija

Barbara Nikolić

Rooseveltova trg 6, Zagreb

Demencija predstavlja sindrom globalnog i progresivnog oštećenja stečenih kognitivnih sposobnosti pri očuvanoj svijesti, s posebno zahvaćenim funkcijama pamćenja, učenja, apstraktnog mišljenja, orijentacije i poimanja vidno-prostornih odnosa. Progresivne se demencije za sada ne mogu potpuno izliječiti niti značajnije zaustaviti pa, s obzirom na ubrzano starenje stanovništva i produljenje životnog vijeka, u skorijoj budućnosti predstavljaju jedan od vodećih medicinskih, društvenih i ekonomskih globalnih problema. Sve više istraživanja upućuje na moguću ulogu serotoniniskog sustava u različitim kognitivnim funkcijama poput učenja i pamćenja i to posebice receptora 5-HT₆. Utvrđena je i povezanost pojedinih polimorfizama u genu za receptor 5-HT₆ s Alzheimerovom bolešću, iako su rezultati istraživanja oprečni. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi moguću povezanost polimorfizma C267T (rs1805054) u genu za serotonininski receptor 5-HT₆ (*HTR6*) s razvojem progresivnih demencija. Rezultati našeg istraživanja nisu uputili na povezanost polimorfizma rs1805054 gena *HTR6*, s razvojem demencije u bolesnika s blagim kognitivnim poremećajem, Alzheimerovom bolešću i ostalim oblicima demencija poput vaskularne demencije, frontotemporalne demencije i demencije s Lewyjevim tjelešcima. U svrhu razjašnjavanja uloge serotoniniskog receptora 5-HT₆ i gena *HTR6* u razvoju demencije, potrebna su daljnja opširnija istraživanja koje će uključiti različite populacije, različite tipove demencija i veći broj ispitanika.

(38 stranica, 16 slika, 8 tablica, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, blagi kognitivni poremećaj, vaskularna demencija, frontotemporalna demencija, demencija s Lewyjevim tjelešcima, rs1805054, polimorfizam gena *HTR6*

Voditelj: Dr. sc. Dubravka Švob Štrac, znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković

Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, Prirodoslovno-matematički fakultet

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

5-HT₆ serotonin receptor gene polymorphism and dementia

Barbara Nikolić

Rooseveltova trg 6, Zagreb

Dementia is a syndrome of global and progressive deterioration of acquired cognitive skills with preserved consciousness, where memory, learning, abstract thinking, orientation and understanding of visual-spatial relationships are particularly affected. As the progressive dementias for now cannot be healed or significantly halted, given the aging population and increasing life expectancy, in the near future dementia will become one of the leading medical, social and economic global problems. Increasing number of studies suggest the potential role of the serotonergic system, particularly 5-HT₆ receptors, in various cognitive functions such as learning and memory. The associations of individual polymorphisms in the gene coding for 5-HT₆ receptor with Alzheimer's disease have been found, although the results are controversial. The aim of this study was to determine the possible association of polymorphism C267T (rs1805054) in the *HTR6* gene, coding for the serotonin 5-HT₆ receptor, with the development of progressive dementia. The results of our study have not suggested the association of rs1805054 polymorphism in the *HTR6* gene with the development of dementia in patients with mild cognitive impairment, Alzheimer's disease and other types of dementia such as vascular dementia, frontotemporal dementia and dementia with Lewy bodies. Further extensive studies including different populations, different types of dementia and higher number of participants are needed in order to elucidate the role of serotonin 5-HT₆ receptor and *HTR6* gene in the pathogenesis of dementia.

(38 pages, 16 pictures, 8 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, vascular dementia, frontotemporal dementia, Lewy body dementia, rs1805054, *HTR6* gene polymorphism

Supervisor: Dubravka Švob Štrac, PhD, Research Associate, RBI

Co-supervisor: Dubravka Hranilović, Assoc. Prof., PhD, Faculty of Science

Reviewers:

Thesis accepted:

POPIS KRATICA

A β – amiloid- β peptid

AB – Alzheimerova bolest

ACD – dekstroza citratne kiseline (*Acid citrate dextrose*)

ADAS - skala procjene Alzheimerove bolesti (*Alzheimer's disease assessment scale*)

APP – amiloid prekursorski protein

BPRS - kratka psihijatrijska skala (*Brief psychiatric rating scale*)

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

CDT – test crtanja sata (*Clock drawing test*)

DAG – diacil-glicerol

DLB – demencija s Lewyjevim tjelešcima (*Dementia with Lewy bodies*)

DSM-IV – Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje IV (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders IV edition*)

EDTA – etilen-diamin-tetraoctena kiselina

FTD – frontotemporalna demencija (*Frontotemporal dementia*)

FRET – energetski transfer Förster tipa (*Förster-type energy transfer*)

GABA - γ -amino-maslačna kiselina

GPCR – receptori povezani s G proteinom (*G protein coupled receptors*)

HW – Hardy-Weinbergova ravnoteža

IP-3 – inozitol-3-fosfat

MCI – blagi kognitivni poremećaj (*Mild cognitive impairment*)

MGB – ligand manjeg utora DNA (*Minor groove binder*)

MMSE - test procjene mentalnog stanja (*Mini-mental state examination*)

mRNA-glasnička RNA (*messenger RNA*)

NFQ – nefluorescencijski prigušivač (*Nonfluorescent quencher*)

NINCDS-ADRDA – Nacionalni institut za neurološke i komunikacijske poremećaje i moždani udar – Udruga za Alzheimerovu bolest i povezane poremećaje (*National institute of neurological and communicative disorders and stroke – Alzheimer's disease and related disorders association*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (*Polymerase chain reaction*)

PDD – demencija povezana s Parkinsonovom bolesti (*Parkinson disease dementia*)

RCLB – pufer za lizu eritrocita (*Red cell lysis buffer*)

REM- faza sna s brzim pokretima očiju (*Rapid eye movement*)

RPM – okretaj u minuti (*Rotation per minute*)

SDS – natrij-dodecil sulfat

SE pufer – natrij-EDTA pufer

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (*Single nucleotide polymorphism*)

TE pufer – tris-EDTA pufer

VaD – vaskularna demencija (*Vascular dementia*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*World health organisation*)

SADRŽAJ

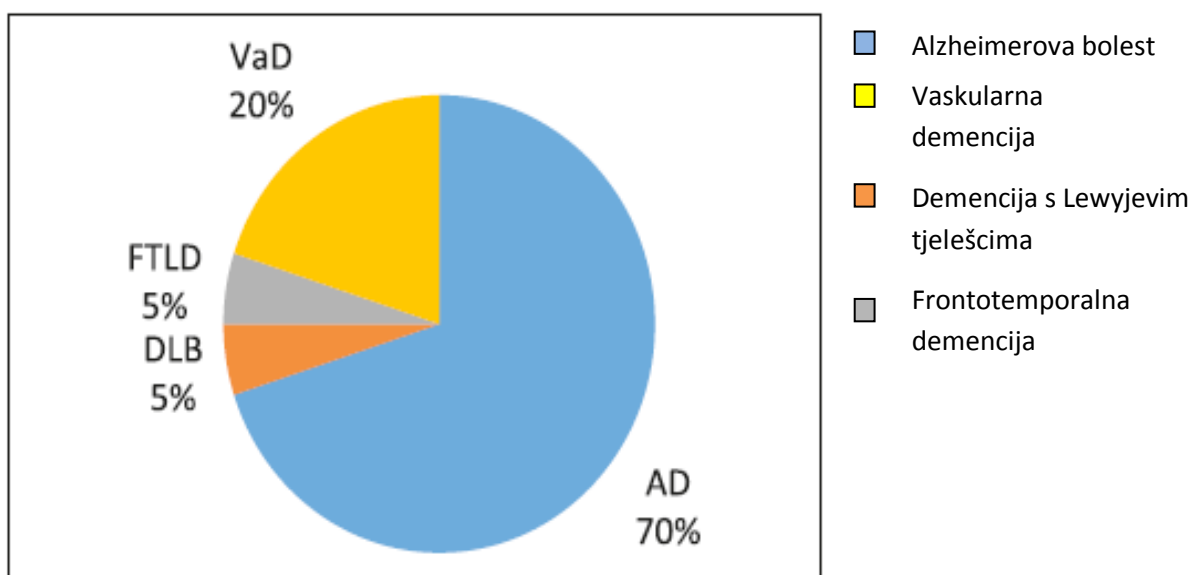
1. UVOD.....	1
1.1 Demencije.....	1
1.1.1 Alzheimerova bolest.....	2
1.1.2 Demencija s Lewyjevim tjelešcima.....	5
1.1.3 Vaskularna demencija.....	6
1.1.4 Frontotemporalna demencija.....	7
1.1.5 Blagi kognitivni poremećaj.....	8
1.2 Uloga serotonina u demenciji.....	9
1.3 Receptori 5-HT ₆	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1 Ispitanici.....	13
3.1.1 Klinička obrada ispitanika.....	13
3.1.2 Psihometrijski testovi u dijagnozi demencije.....	13
3.1.2.1 Test procjene mentalnog stanja.....	14
3.1.2.2 Test crtanja sata.....	14
3.1.2.3 Skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala (ADAS-Cog.....	15
3.1.3 Etički aspekt istraživanja.....	16
3.2 Izolacija DNA iz krvi.....	16
3.3 Određivanje genotipova metodom real-time PCR.....	17
3.4 Statistička obrada podataka.....	19
4. REZULTATI.....	20
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČAK.....	32
7. LITERATURA.....	34
8. ŽIVOTOPIS.....	39

1. UVOD

1.1 Demencije

Demencija je sindrom, najčešće kronične i progresivne prirode, koji se očituje u pogoršanju kognitivnih funkcija kakvo se ne očekuje pri normalnom starenju. Obilježavaju je poremećaji u pamćenju, razmišljanju, orijentaciji, razumijevanju, prosudbi i govoru, dok svijest ostaje očuvana. Kako bolest napreduje, dolazi i do promjena u ponašanju, nemogućnosti kontrole emocija i manjka motivacije. Procjenjuje se da trenutno u svijetu 47.5 milijuna ljudi boluje od demencije, a svake se godine pojavi 7.7 milijuna novih slučajeva (WHO 2015). U Zapadnoj Europi broj ljudi oboljelih od nekog oblika demencije iznosi 7 milijuna, zatim slijedi Istočna Azija sa 5.5 milijuna, Južna Azija sa 4.5 milijuna i Sjeverna Amerika sa 4.4 milijuna (Prince i sur. 2013). U Hrvatskoj ne postoji službeni registar bolesnika s demencijama, ali smatra se da se broj oboljelih kreće između 50 000 i 80 000 osoba. Ovi podaci upućuju na veliki socijalni i ekonomski teret koji pada na skrbnike, obitelji, zdravstvo i u konačnici na cijelo društvo kada oboljeli izgube sposobnost samostalnog života. Zbog toga se različiti aspekti demencija intenzivno istražuju, od proučavanja genetičke podloge, okolišnih čimbenika, tijeka patoloških procesa do potencijalne prevencije nastanka bolesti (WHO 2015). Prema patološkim specifičnostima i zahvaćenim moždanim regijama progresivne demencije se mogu podijeliti na Alzheimerovu bolest (AB, engl. *Alzheimer's disease*), vaskularnu demenciju (VaD, engl. *Vascular dementia*), demenciju s Lewyjevim tjelešcima (DLB, engl. *Dementia with Lewy bodies*) i frontotemporalnu demenciju (FTD, engl. *Frontotemporal dementia*) (Cunningham i sur. 2015). Granice između ovih bolesti nisu uvijek jasne, a postoje i kombinirani oblici demencija. Alzheimerova bolest je najrašireniji oblik demencije, a obuhvaća 60 do 70% slučajeva (WHO 2015). Prosječna zastupljenost pojedinih demencija prikazana je na slici 1.

Simptomi demencija variraju od osobe do osobe, a ovise o tipu demencije i stupnju bolesti. Rani stupanj najčešće obilježavaju zaboravnost i povremeni gubitak pojma o vremenu, a budući da se simptomi javljaju postupno, bolest u ovom stupnju često biva zanemarena. U srednjem stupnju simptomi postaju očitiji, jer bolesnici počinju zaboravljati nedavne događaje i imena ljudi, gube se u prostoru, imaju otežanu komunikaciju i veće promjene u ponašanju. U kasnom stupnju bolesnik postaje potpuno ovisan o tuđoj brizi zbog gubitka općeg pojma o prostoru i vremenu, nemogućnosti komunikacije, hodanja i brige za sebe (WHO 2015).



Slika 1. Zastupljenost pojedinih demencija u svijetu (Cunningham i sur. 2015).

Iako su mnogi lijekovi u procesu kliničkih istraživanja, trenutno ne postoji učinkovit način izlječenja demencije. Zbog toga se zdravstvena zajednica zasad fokusira na postavljanje rane dijagnoze, uočavanje i tretiranje bihevioralnih i psiholoških simptoma, pružanje psihološke podrške obitelji/skrbnicima, te podizanje društvene svijesti o demencijama (WHO 2015). Za ranu dijagnozu i točnu prognozu bolesti potrebno je pronaći pouzdane dijagnostičke i prognostičke biljege što još uvijek predstavlja problem zbog različitog razvoja bolesti u pojedinaca (Cunningham i sur. 2015).

1.1.1 Alzheimerova bolest

Kao najzastupljenija demencija, Alzheimerova bolest jedan je od vodećih zdravstvenih problema današnjice. Prema posljednjim podacima, u Americi oko 5.3 milijuna ljudi u dobi od 65 ili više godina boluje od Alzheimerove bolesti, dok je broj oboljelih mlađih od 65 godina procijenjen na 200 000 osoba (Alzheimer's Association 2015).

Alzheimerova bolest može se podijeliti na dva oblika: familijarni i sporadični. Familijarni oblik čini 5% slučajeva, a uzrokovan je mutacijama u pojedinačnim genima i nasljeđuje se unutar obitelji u autosomno dominantnom obliku. Kod familijarnog oblika bolest često ima raniji početak, što znači da se razvija prije 65 godine. Sporadični oblik zastupljen je u najvećem broju slučajeva, a uzrokovan je kombinacijom različitih genetičkih, epigenetičkih i okolišnih čimbenika (Edginton i sur. 2009).

Postoji nekoliko čimbenika za koje se zasad zna da povećavaju rizik za sporadičnu Alzheimerovu bolest. Najvažniji čimbenik rizika je starenje, jer se nakon 65 godine incidencija bolesti udvostručuje svakih pet godina. Na 100 000 ljudi starijih od 65 godina, svake se godine dijagnosticira 1275 novih slučajeva Alzheimerove bolesti (Querfurth i LaFerla 2010). Drugi potencijalni okolišni čimbenici su diabetes mellitus, hipertenzija i pretilost u srednjoj životnoj dobi, pušenje, depresija, kognitivna neaktivnost i niska razina obrazovanja, te fizička neaktivnost (Barnes i Yaffe 2011). Ipak, točan mehanizam nastanka još uvijek nije poznat.

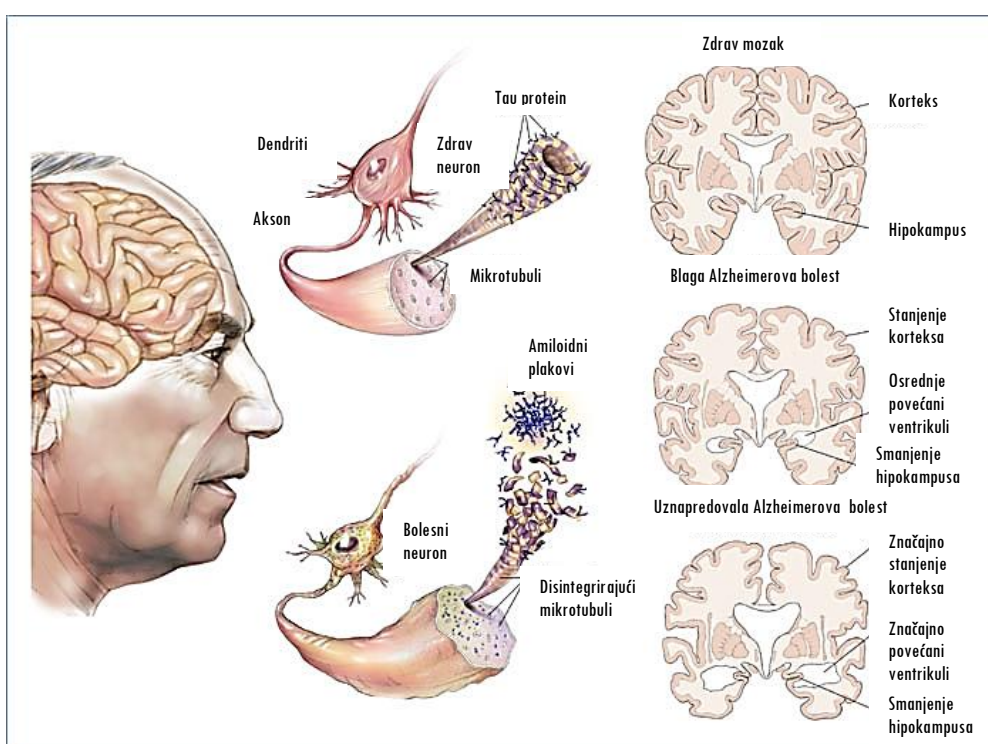
Glavne patološke karakteristike Alzheimerove bolesti su izvanstanični plakovi amiloid- β peptida ($A\beta$) i unutarstanični neurofibrilarni snopići hiperfosforiliranog tau proteina koji ometaju normalno funkcioniranje neurona i sinaptičku transmisiju (Slika 2). Propadanje kolinergičkih projekcija dokazano je povezano s nakupljanjem $A\beta$ i tau proteina (Querfurth i LaFerla 2010). Iako Alzheimerova bolest prvenstveno uzrokuje gubitak neurona u specifičnim regijama kao što su piramidalni neuroni 2. sloja moždane kore entorinalnog korteksa i CA1 regije hipokampusa, dolazi i do općeg gubitka moždanog volumena zbog nedostatka neuronskih procesa (Huang i Mucke 2012).

$A\beta$ peptid nastaje amiloidogeničnom preradom iz amiloidnog prekursorskog proteina (APP) koji ima karakteristike membranskog receptora i eksprimiran je u raznim tkivima, posebice u sinapsama neurona kao dio normalnog metabolizma. Smatra se da je APP uključen u sinaptičku formaciju, popravak, signalizaciju i staničnu adheziju (Edginton i sur. 2009). Proteolizom APP-a putem kompleksa BACE-1 (engl. *beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*) i γ -sekretaze, proteinskog kompleksa s katalitičkom jezgrom građenom od presenilina 1, nastaju monomeri $A\beta$. Njihova normalna funkcija još nije posve poznata, ali je moguće da $A\beta$ ima ulogu u smanjenju ekscitacijske transmisije i sprječavanju neuronske hiperaktivnosti. Poremećena ravnoteža u produkciji i eliminaciji $A\beta$ peptida dovodi do povećane agregacije i stvaranja patoloških plakova (Querfurth i LaFerla 2010).

Mutacije u tri gena – amiloidnom prekursorskom proteinu, presenilinu 1 i presenilinu 2 uzrokuju promijenjenu i povećanu produkciju $A\beta$, te su glavni uzrok familijarne Alzheimerove bolesti (Huang i Mucke 2012), dok se za sporadični oblik ne zna točan uzrok nastanka plakova. Zasad je dokazana genetička povezanost s apolipoproteinom E4 koji povećava rizik od nastanka plakova i obolijevanja od Alzheimerove bolesti, ovisno o varijanti gena. Nosioци jednog alela E4 imaju povećani čimbenik rizika 4, dok nosioци dva alela imaju povećani čimbenik rizika 19 (Querfurth i LaFerla 2010). Promjene vezane uz proces starenja kao što su povećani oksidacijski stres, narušena funkcija endoplazmatskog retikuluma u

pravilnom smotavanju proteina, nedostatak proteosomske aktivnosti i autofagičnog uklanjanja oštećenih proteina također ubrzavaju nakupljanje A β i tau agregata (Querfurth i LaFerla 2010).

Protein tau je u topivom obliku inače normalno prisutan u aksonima neurona gdje potiče okupljanje tubulina i stabilizaciju mikrotubula i transportnih vezikula. U hiperfosforiliranom obliku on postaje netopiv, gubi afinitet za mikrotubule i međusobno agregira u zavojite filamentozne strukture koje se u Alzheimerovoj bolesti najčešće uočavaju u piramidalnim neuronima. Broj neurofibrilarnih snopova je patološki biljeg težine Alzheimerove bolesti (Querfurth i LaFerla 2010).



Slika 2. Glavne patološke karakteristike Alzheimerove bolesti su izvanstanični plakovi amiloid- β peptida (A β) i unutarstanični neurofibrilarni snopići hiperfosforiliranog tau proteina (preuzeto sa <http://sierram.web.unc.edu/2011/04/22/caffeine-and-alzheimers-disease/>)

Proteinske aggregate prepoznaju i fagocitiraju stanice mikroglije i aktivirani astrociti, no uslijed Alzheimerove bolesti dolazi do njihove prekomjerne i kronične aktivacije koja u konačnici rezultira dodatnim oštećenjem tkiva. Aktivirana mikroglija otpušta kemokine kojima privlače monocite iz krvi i različite upalne citokine kojima pridonose stvaranju upale i otpuštanju slobodnih radikala u područjima plakova.

Ovaj začarani krug pridonosi napredovanju bolesti i zato upućuje na potrebu pristupa liječenja iz više različitih smjerova (Querfurth i LaFerla 2010). Iako još ne postoji učinkovit način liječenja Alzheimerove bolesti, zasad se provode klinička istraživanja za inhibitor γ -sekretaze (LY450139), čimbenike koji blokiraju agregaciju A β , potencijalne vakcine s A β i monoklonalna protutijela protiv različitih A β epitopa (Querfurth i LaFerla 2010).

1.1.2 Demencija s Lewyjevim tjelešcima

Demencija s Lewyjevim tjelešcima (DLB), nakon Alzheimerove bolesti, predstavlja jedan od najčešćih uzroka neurodegenerativnih demencija u starijih ljudi (McKeith i sur. 2004) s prevalencijom do 5% i incidencijom od 0.1% u općoj populaciji (Zaccai i sur. 2005). Glavni klinički simptomi DLB su fluktuirajući kognitivni poremećaji (mogu varirati iz sata u sat, dana u dan), povremene vizualne halucinacije i parkinsonizam. Kako bolest napreduje simptomi postaju sve gori, a u nekim slučajevima javljaju se i druge karakteristike koje upućuju na DLB, kao što su poremećaji u REM fazi sna, ozbiljna neuroleptička osjetljivost, povremeni gubitak svijesti, depresija ili anksioznost (Bogaerts i sur. 2007).

Lewyjeva tjelešca su nakupine unutar neurona građene od abnormalno fosforiliranih, neurofilamentoznih proteina agregiranih s ubikvitinom i α -sinukleinom (Slika 3). Do nakupljanja Lewyjevih tjelešaca i gubitka neurona u području moždanog debla dolazi i u Parkinsonovoj bolesti, te u tom slučaju nastaje poremećaj pokretanja. U slučaju demencije Lewyjeva tjelešca se stvaraju u paralimbičkim i neokortikalnim strukturama. Bolest obilježava nedostatak kolinergičke transmisije u neokorteksu zbog degeneracije neuronskih projekcija iz moždanog debla što dovodi do poremećaja u percepciji, razmišljanju i ponašanju (McKeith 2002).



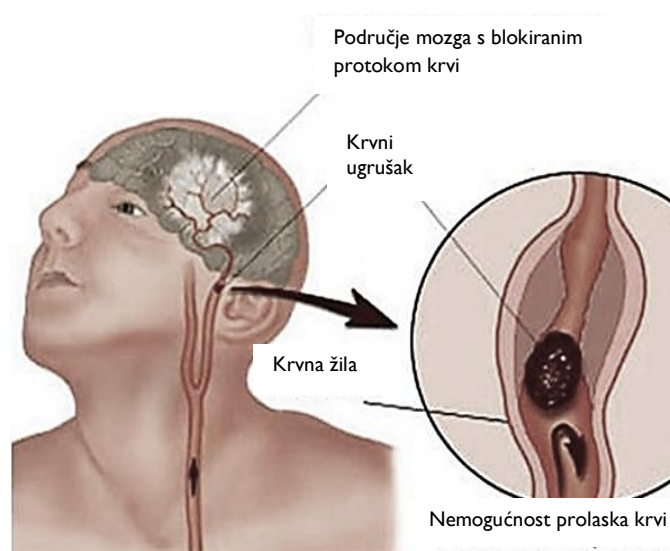
Slika 3. Lewyjeva tjelešca u mozgu oboljelih od demencije s Lewyjevim tjelešcima (preuzeto sa <http://alzheimers-review.blogspot.hr/2015/09/frontotemporal-dementia-ftd-or-picks.html>)

Demencija koju karakterizira stvaranje Lewyjevih tjelešaca može postojati u zasebnom obliku (DLB) ili se može naći u kombinaciji s Parkinsonovom ili znakovima Alzheimerove bolesti. DLB dijeli mnoge kliničke i patološke karakteristike s demencijom koja se razvija uslijed Parkinsonove bolesti (PDD, engl. *Parkinson's disease dementia*). Zasad postoji tzv. „pravilo od jedne godine“ koje služi za razlikovanje DLB i PDD. DLB obilježava nastanak demencije unutar 12 mjeseci od nastanka obilježja parkinsonizma, dok se bolest svrstava u PDD ako do demencije dođe nakon više od 12 mjeseci od pojave parkinsonizma (McKeith i sur. 2004). Uz patološke značajke DLB, u većem broju pacijenata mogu se javiti i promjene tipične za Alzheimerovu bolest poput difuznih i neuritičnih senilnih plakova, ali je u tom slučaju količina neurofibrilarnih nakupina tau proteina znatno manja (McKeith 2002).

DLB se uglavnom smatra sporadičnim kompleksnim poremećajem koji nastaje uslijed kombiniranog djelovanja genetičkih i okolišnih čimbenika, iako postoje i rijetki slučajevi familijarnog nasljeđivanja. Molekularna genetička istraživanja identificirala su nekoliko genetičkih mutacija povezanih s DLB, sugerirajući veliku genetičku heterogenost u razvoju ove bolesti (Bogaerts i sur. 2007).

1.1.3 Vaskularna demencija

Vaskularna demencija (VaD) je poremećaj pamćenja i kognitivnih funkcija koji proizlazi iz cerebrovaskularnih bolesti kao što je moždani udar, gdje zbog nedostatne opskrbe krvlju dolazi do odumiranja neurona, a pretpostavlja se da čini 20 do 40% svih demencija (Slika 4).



Slika 4. Vaskularna demencija

(preuzeto sa <http://alzheimers-review.blogspot.hr/2013/11/vascular-dementia-or-alzheimers-disease.html>)

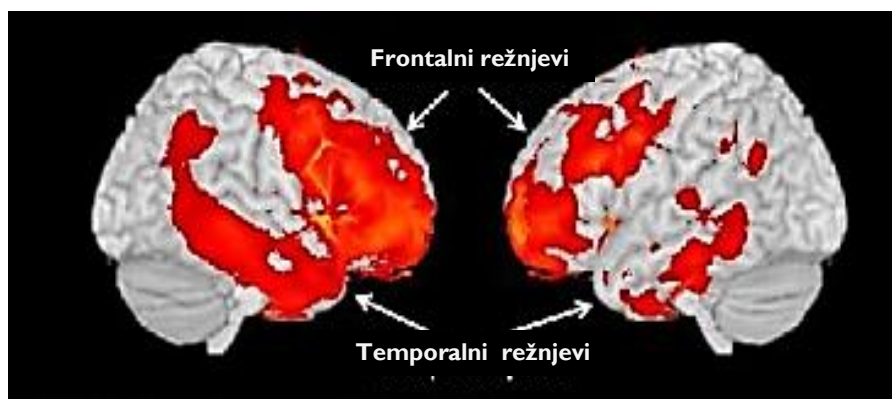
Budući da se 75% slučajeva moždanog udara dogodi kod ljudi starijih od 65 godina, može se reći da godine predstavljaju najveći čimbenik rizika za obolijevanje od VaD. U druge rizike ubrajaju se hipertenzija, diabetes mellitus, metabolički sindrom, mikrovaskularna retinopatija, hiperlipidemija i pušenje (Lee 2011).

Ovisno o području mozga zahvaćenom moždanim udarom i težini ozlijede, simptomi mogu biti raznoliki, od naglog gubitka pamćenja, poremećaja u razmišljanju i percepciji u slučaju jačeg moždanog udara, do postepenih promjena u slučaju višestrukih malih moždanih udara.

1.1.4 Frontotemporalna demencija

Frontotemporalna demencija (FTD) je progresivni poremećaj koji nastaje zbog atrofije frontotemporalnog područja mozga (Slika 5) i čini 10% ukupnih slučajeva demencija (National institute on aging 2014). Ova se demencija, za razliku od većine slučajeva Alzheimerove bolesti, javlja između 35 i 75 godine života. Pretpostavlja se da 20 do 40% bolesnika ima familijarni oblik, dok se kod ostalih radi o sporadičnom obliku bolesti (McKhann i sur. 2001).

Poremećaj može započeti u frontalnom, temporalnom režnju ili u oba istovremeno. Karakterizira ga progresija tijekom vremena, dok ostali dijelovi mozga ostaju očuvani, uključujući i one odgovorne za kratkotrajno pamćenje. Glavne patološke promjene su gubitak neurona, abnormalne količine proteina tau i TDP-4. Ovisno o zahvaćenom području, javljaju se različite kognitivne i bihevioralne poteškoće poput problema s planiranjem, impulzivnošću, ponavljanjem radnji ili riječi.



Slika 5. Frontotemporalna demencija

(preuzeto sa <http://hudsonvalleynewsnetwork.com/2015/08/07/dementia-part-4-frontotemporal-fts/>)

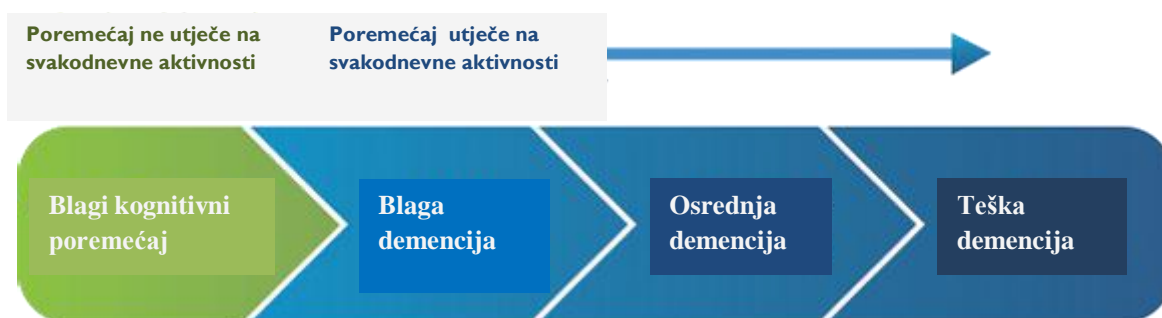
U prošlosti je ova bolest nazvana Pickovom bolesti, prema njemačkom znanstveniku Arnoldu Picku koji ju je prvi opisao 1892. godine, a danas se naziv „Pickova tjelešca“ koristi za abnormalne nakupine tau proteina u mozgu. Kod nekih se pacijenata sa FTD mogu pronaći Pickova tjelešca, ali to nije opće pravilo (National institute on aging 2014).

Nekoliko je gena dosad dovedeno u vezu s razvojem FTD. Pokazano je da određene mutacije u genu *MAPT* uzrokuju stvaranje abnormalnih agregata tau proteina i posljedično razaranje neurona, a nasljeđivanje ove mutacije najčešći je uzrok familijarnog oblika FTD. Mutacije gena *PGRN*, *VCP*, *CHMP2B*, *TARDBP*, *FUS* uzrokuju vrlo rijetke oblike frontotemporalnih poremećaja (National institute on aging 2014).

1.1.5 Blagi kognitivni poremećaj

Blagi kognitivni poremećaj (MCI, engl. *Mild cognitive impairment*) je definiran kao sindrom smanjena kognitivnih sposobnosti koje nije očekivano za godine i edukacijsku razinu pojedinca, ali ne ometa znatno aktivnosti u svakodnevnom životu (Gauthier i sur. 2006).

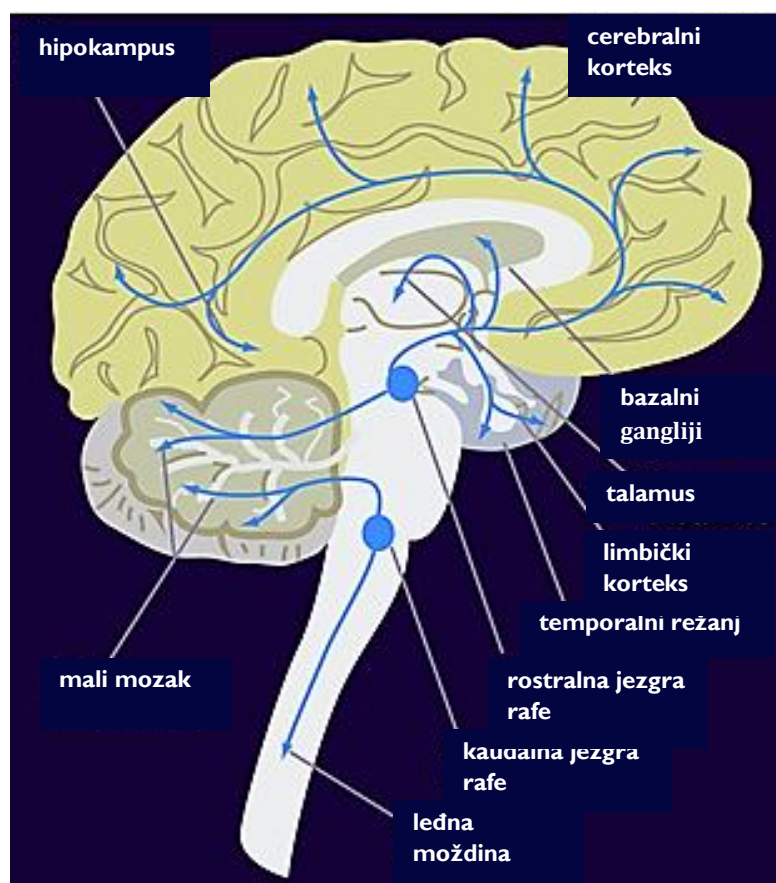
Prevalencija MCI u populaciji starijoj od 65 godina iznosi 3 do 19% i predstavlja rizik za kasnije razvijanje Alzheimerove bolesti ili drugih demencija u više od polovice pacijenata, najčešće unutar pet godina (Slika 6). Točni uzroci MCI nisu poznati, ali kao i kod demencija čimbenici rizika su starija dob, slučajevi u obitelji i kardiovaskularne bolesti. Od patoloških promjena u MCI utvrđene su kolinergička disfunkcija, lezije bijele tvari i mali moždani udari, odlaganje izvanstaničnih amiloidnih agregata i unutarstaničnih neurofibrilarnih nakupina. Ipak, u odnosu na pacijente s demencijom i zdrave ljude, pojedinci s blagim kognitivnim poremećajem imaju srednje količine amiloidnih i tau agregata u središtima temporalnih režnjeva (Gauthier i sur. 2006).



Slika 6. Progresija iz blagog kognitivnog poremećaja u demenciju
(preuzeto sa <https://www.mccare.com/education/mcidementia.html>)

1.2 Uloga serotonina u demenciji

Serotonin ili 5-hidroksitriptamin (5-HT) je monoamin koji nastaje hidroksilacijom i dekarboksilacijom aminokiseline triptofana. Kao neurotransmitor u središnjem živčanom sustavu nastaje u neuronima medijalne i dorzalne jezgre rafe koji svojim projekcijama inerviraju prednji mozak (korteks, bazalne ganglije, hipokampus, hipotalamus) (Slika 7).



Slika 7. Serotoninski putovi u mozgu (preuzeto sa https://www.cnsforum.com/educationalresources/imagebank/normal_brain/neuro_path_sn)

Neuroanatomska istraživanja na animalnim modelima neurodegeneracije potvrdila su da sve ove regije koje inerviraju serotonergički neuroni imaju značajnu ulogu u koncentraciji te stjecanju i prizivanju pamćenja, stoga se postavlja pitanje o ulozi serotonina i njegovih receptora u patologiji Alzheimerove bolesti i drugih demencija (Trillo i sur. 2013). Sve više istraživanja upućuje na moguću ulogu serotonina i serotoninskih receptora u različitim kognitivnim funkcijama, kao i u kognitivnim nedostacima, te u opadanju učenja i pamćenja (Roth i sur., 2004; Xu i sur., 2012; Garcia-Alloza i sur. 2004; Lorke i sur. 2006).

Serotonin regulira različite funkcije kao što su raspoloženje, agresivnost, hranjenje i spavanje, a preko modulacije kolinergičkih neurona utječe i na kognitivne procese kao što su pamćenje i učenje. Post-mortem istraživanja mozгова bolesnika s Alzheimerovom bolesti pokazala su smanjenu razinu serotonina i njegovih metabolita (Meltzer i sur. 1998). Palmer i sur. zaključili su kako degeneracija serotonergičkih neurona počinje u temporalnom i parijetalnom korteksu te hipokampusu, a zatim se širi na uzlazne serotonergičke putove (Palmer i sur. 1987).

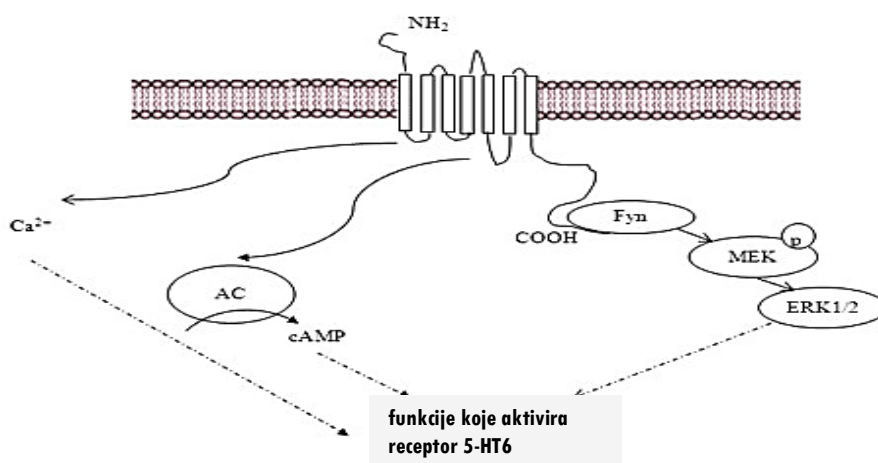
Zasad se ne može sa sigurnošću reći jesu li ove promjene uzrok ili posljedica neurodegeneracije u Alzheimerovoj bolesti, ali je dokazano kako serotonin smanjuje produkciju A β . Cirrito i sur. tretirali su miševe sa SSRI (engl. *selective serotonin reuptake inhibitor*), te su uspjeli smanjiti A β plakove za čak 50%. Pretpostavlja se da serotonin preko pojedinih receptora aktivira signalnu kaskadu koja mijenja procesiranje APP u ne-amiloidni put (Cirrito i sur. 2011).

Djelovanje serotonina određeno je interakcijama sa 16 različitih serotonininskih receptora koji su podijeljeni u 7 pod-obitelji prema primarnom fiziološkom mehanizmu, od 5-HT1 do 5-HT7 (Hoyer i Martin 1997). Svi, osim ionotropnog receptora 5-HT3, pripadaju metabotropnoj GPCR (engl. *G protein-coupled receptors*) obitelji receptora, te aktivacijom G proteina moduliraju unutarstanični prijenos signala poput inhibicije ili aktivacije adenilat ciklaze/protein kinaze A te stimulacije fosfolipaze C/protein kinaze C (Xu i sur. 2012). Receptori 5-HT1 i 5-HT5 smanjuju stvaranje cAMP i djeluju inhibicijski, a receptori 5-HT2 koji povećavaju stvaranje inozitol-3-fosfata (IP-3) i diacil-glicerola (DAG), kao i receptori 5-HT4, 5-HT6 i 5-HT7 koji povećavaju stvaranje cAMP, djeluju ekscitacijski. Poremećaji u ovim receptorima i njihovoj zastupljenosti u mozgu mogu negativno utjecati na prenošenje signala i kognitivne procese u neurodegenerativnim bolestima (Xu i sur. 2012).

1.3 Receptori 5-HT6

Receptori 5-HT6 otkriveni su 1993. godine kao najnoviji član 5-HT receptorske super-obitelji. Građeni su od sedam transmembranskih domena, a specifični su zbog kratke treće citoplazmatske petlje, i dugačkog C-terminalnog repa. Eksprimirani su isključivo u središnjem živčanom sustavu kao postsinaptički membranski receptori (Ramirez 2013). Kod štakora je najveća gustoća ovih receptora zamijećena u olfaktornom tuberkulu, frontalnom i entorinalnom korteksu, dorzalnom hipokampusu, nukleusu akumbensu, te strijatumu, dok su niže razine zastupljene u hipotalamusu, amigdali, substanciji nigri i u nekoliko diencefaličkih jezgara (Gerard i sur. 1997).

Dokazano je kako ovi receptori mogu djelovati na nekoliko različitih unutarstaničnih signalnih putova. Preko G proteina mogu aktivirati adenilat ciklazu te uzrokovati povećanje produkcije cAMP, a ako se pak uključe u Ca^{2+} signalizacijski put mogu povećati razinu unutarstaničnog kalcija. Karboksi-terminalna regija receptora 5-HT6 može međudjelovati s Fyn tirozin kinazom (član Src ne-receptorskih protein tirozin kinaza) te preko nje aktivirati ERK1/2 (Slika 8.). Već otprije se zna da je kinaza pERK1 uključena u fosforilaciju tau proteina, a nedavna istraživanja su pokazala kako i Fyn kinaza može fosforilirati tau tirozinske ostatke. Prema navedenim saznanjima može se zaključiti kako bi pojačana aktivacija receptora 5-HT6 mogla uzrokovati prekomjernu fosforilaciju tau proteina i posljedično stvaranje njegovih agregata (Ramirez 2013).



Slika 8. Signalni putovi koje aktiviraju receptori 5-HT6. Uz aktivaciju cAMP signalizacije, 5-HT6 receptori aktiviraju i Ca^{2+} signalni put, te kinazu ERK1/2 preko Fyn-ovisnog puta (Ramirez 2013).

Sve više istraživanja upućuje na moguću ulogu receptora 5-HT6 u kognitivnim funkcijama (Mitchell i Neumaier, 2005). Budući da su receptori 5-HT6 lokalizirani u dijelovima mozga bitnim za učenje i pamćenje, istraživana je njihova uloga u tim procesima i povezanost s kolinergičkim i glutamanergičkim neuronima. Riemer i sur. pokazali su kako antagonist receptora 5-HT6 povećava otpuštanje acetilkolina u korteksu (Riemer i sur. 2003), ali Marcos i sur. nisu uspjeli dokazati postojanje receptora 5-HT6 na kolinergičkim neuronima (Marcos i sur. 2006). Tretman s 5-HT6 antagonistom povećao je razine glutamata u frontalnom korteksu i hipokampusu štakora (Dawson i sur. 2001), dok je agonist uzrokovao smanjenje razine glutamata (Schechter i sur. 2008). Postojanje receptora 5-HT6 dokazano je na GABA-ergičkim neuronima u području hipokampusa (West i sur. 2009), stoga se smatra

da se modulacija otpuštanja acetilkolina i glutamata odvija posredno putem aktivacije/inhibicije GABA-ergičkih neurona (Ramirez 2013).

Na temelju određenih predkliničkih studija (Bourson i sur. 1995; Meneses 2001) razvijeni su određeni ligandi serotoninских receptora sa sposobnošću promjene ili poboljšanja pamćenja/kognicije (Upton i sur. 2008; Ramirez i sur. 2014). Prilikom istraživanja utjecaja liganada receptora 5-HT₆ na kogniciju u životinjskim modelima, i agonisti i antagonisti su pokazali pro-kognitivne rezultate. Ovi slični učinci aktivacije i inhibicije receptora mogu se objasniti različitim signalnim putovima koje aktivira vezanje na receptor 5-HT₆. Ipak, najviše se istražuje moguće terapijsko djelovanje antagonista receptora 5-HT₆ na kognitivne poremećaje. Tretman s antagonistima receptora 5-HT₆ prvenstveno djeluje simptomatski, i vjerojatno najveći učinak postiže modulacijom otpuštanja neurotransmitora koja je u bolesti poremećena. U kliničkoj fazi II istraživanja trenutno se nalaze SB-742457, koji je pokazao poboljšanje u kognitivnim i globalnim funkcijama u Alzheimerovoj bolesti, te Lu-AE-58054.

Zbog uloge receptora 5-HT₆ u kogniciji, on se može smatrati genom kandidatom uključenim u razvoj Alzheimerove bolesti i drugih demencija (Liu i sur. 2001). Nedavno je otkriven polimorfizam C267T gena *HTR6*, koji spada u tihe polimorfizme, jer ne uzrokuje promjenu aminokiseline tirozina. Ipak, čak i tihi polimorfizmi mogu utjecati na ekspresiju gena djelujući na izrezivanje ili stabilnost mRNA (Orlacchio i sur. 2002). Tsai i sur. u svojem su istraživanju pronašli povezanost između C alela ovog polimorfizma i Alzheimerove bolesti, što je uputilo na daljnja istraživanja (Tsai i sur. 1999). Kan i sur. su potvrdili povezanost C alela s Alzheimerovom bolesti s kasnim početkom (engl. *Late-onset Alzheimer's disease*) (Kan i sur. 2004). Osim ovih, druga provedena istraživanja zasad nisu uspjela pronaći povezanost pa se postavlja pitanje veličine uzorka i raspodjele alela u različitim etničkim grupama (Thome i sur. 2001, Orlacchio i sur. 2002).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja je utvrditi moguću povezanost polimorfizma C267T (rs1805054), u genu za serotoninски receptor 5-HT₆ (*HTR6*), s razvojem demencije u bolesnika s blagim kognitivnim poremećajem, Alzheimerovom bolesti i ostalim oblicima demencija poput vaskularne demencije, frontotemporalne demencije i demencije s Lewyjevim tjelešcima. Ovo istraživanje trebalo bi dati bolji uvid u ulogu serotoninских receptora u demenciji, točnije u ulogu receptora 5-HT₆ u razvoju kognitivnih simptoma navedenih progresivnih demencija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

3.1.1 Klinička obrada ispitanika

U istraživanje je uključeno ukupno 214 ispitanika (101 muškarac i 113 žena). Ispitanici uključeni u istraživanje nisu uzimali prethodno nikakve antidementike te nisu bili međusobno u rodu, a svi su liječeni na Klinici za neurologiju i Klinici za psihijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Odgovarajuća dijagnoza ispitanika postavljena je od strane suradnika na projektu, neurologa i psihijataru, temeljem dijagnostičkih (NINCDS-ADRDA i DSM-IV) kriterija, a na osnovi kognitivnog testiranja, analize cerebrospinalnog likvora, kao i neuroslikovnih prikaza. Kod svih bolesnika uzeta je detaljna anamneza, opći, neurološki i neurokognitivni statusi, a simptomi su evaluirani pomoću neuroloških i psihijatrijskih kliničkih instrumenata, strukturiranog kliničkog intervjua i neuropsihijatrijskih i psiholoških ocjenskih ljestvica.

Dijagnoze pacijenata temeljene su na NINCDS-ADRDA (Jack i sur. 2011; McKhann i sur. 1984) i DSM-IV (APA 2000) kriterijima prema kojima demencija mora biti utvrđena kliničkim pregledom i potvrđena neuropsihološkim testiranjem, a kod ispitanika mora biti prisutan deficit, koji prati i progresivno pogoršanje, u dvije ili više kognitivnih domena (koje uključuju i pamćenje). Osoba ne smije imati poremećaj stanja svijesti, sistemsku bolest ili bolesti mozga koje bi mogle utjecati na progresivni deficit pamćenja i kognicije. Također, prvi simptomi bolesti moraju se pojaviti u razdoblju od 40. do 90. godine života (najčešće nakon 65. godine).

3.1.2 Psihometrijski testovi u dijagnozi demencije

U sklopu neurokognitivnog ispitivanja bolesnika, za procjenu kognitivnih oštećenja u demenciji, korišteni su testovi:

- Test procjene mentalnog stanja (MMSE, engl. *Mini-mental state examination*)
- Test crtanja sata (CDT, engl. *Clock drawing test*)
- skala procjene Alzheimerove bolesti (ADAS, engl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale*) - kognitivna podskala (ADAS-Cog)

3.1.2.1 Test procjene mentalnog stanja

MMSE je psihometrijski test (Cockrell i Folstein 1988; Folstein i sur. 1975) koji se najčešće koristi za procjenu kognitivnih sposobnosti u dijagnozi demencije. MMSE se koristi za detekciju razine kognitivnih oštećenja, za praćenje kognitivnih funkcija tijekom vremena te za procjenu efikasnosti terapije. Ovaj test procjenjuje pažnju, budnost, govor, orijentaciju, memoriju, razumijevanje, imenovanje i ponavljanje, čitanje i pisanje, računanje te diskriminaciju lijevo-desno. MMSE se sastoji od različitih pitanja koja se boduju s nula bodova ili s jednim bodom. Najveći zbroj bodova koji osoba može ostvariti na testu MMSE je 30, a veći broj bodova povezuje se s boljim kognitivnim sposobnostima. Prema broju bodova na MMSE-u osobe možemo podijeliti na:

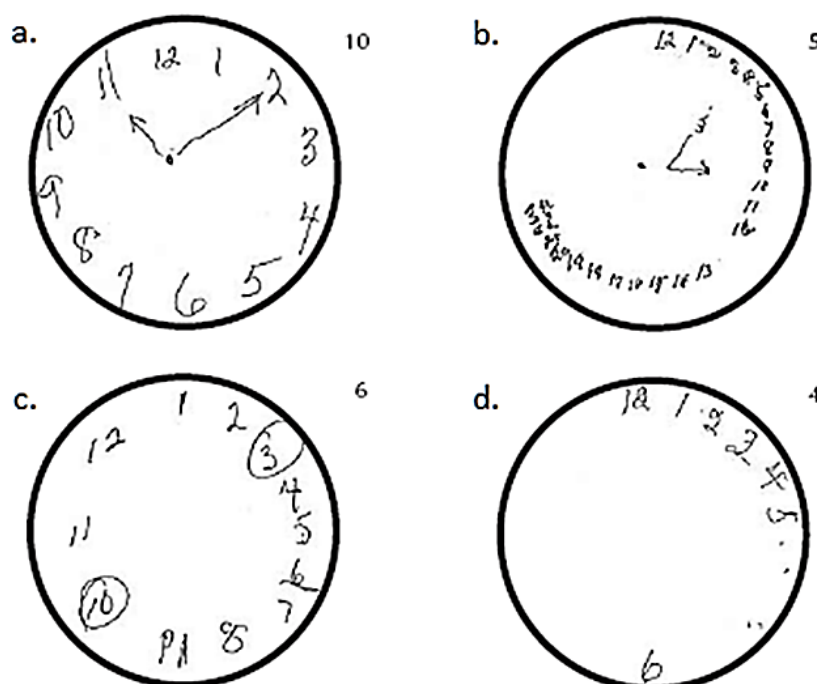
- osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima (broj bodova od 27 do 30),
- osobe s blagom demencijom (broj bodova od 21 do 26),
- osobe s umjerenom demencijom (broj bodova od 10 do 20),
- osobe s teškim oblikom demencije (broj bodova < 10).

3.1.2.2 Test crtanja sata

Test crtanja sata (CDT) je test koji se koristi kao još jedna mjera ozbiljnosti simptoma demencije (Lee i sur. 1996; Sunderland i sur. 1989). Postoji više varijacija u samom načinu primjene testa, ali u pravilu najčešće pacijent dobije ili unaprijed nacrtanu kružnicu u koju mora sam ucrtati brojeve te kazaljke sata koje pokazuju točno određeno vrijeme ili se pacijentu da prazan list papira na koji sam mora ucrtati cijeli sat (kružnicu, brojeve i kazaljke). Vrijeme koje se često zadaje pacijentu da ga naznači na satu je 10 minuta nakon 11 sati. Ovim testom se zapravo procjenjuje funkcioniranje frontalnih i temporo-parijetalnih regija mozga. Prednost ovog testa je što upućuje na ozbiljnost demencije, a trajanje testa je vrlo kratko (oko dvije minute).

Za bodovanje rezultata CDT-a često se koristi metoda koju je definirao Sunderland sa suradnicima (1989), a koja predlaže korištenje unaprijed određenog graničnog broja bodova (≤ 5) koji ukazuje na oštećenje (Slika 8).

Test crtanja sata



Slika 9. Primjer bodovanja testa crtanja sata metodom koju je predložio Sunderland sa sur. (1989): a) broj ostvarenih bodova je 10 (kazaljke sata su u pravilnom položaju); b) broj ostvarenih bodova je 5 (brojevi na satu su svi napisani na jednom okupu ili su napisani u obrnutom smjeru, a kazaljke na satu mogu biti prisutne, ali nisu u točnom položaju); c) broj ostvarenih bodova je 6 (brojevi na satu su u pravilu dobro napisani, ali su kazaljke u pogrešnom položaju); d) broj ostvarenih bodova je 4 (brojevi su u potpunosti pogrešno napisani, često nedostaje dio brojeva ili su napisani izvan kružnice sata).

3.1.2.3 Skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala (ADAS-Cog)

ADAS-Cog je često korišten psihometrijski test za procjenu razine kognitivnog oštećenja u demenciji (Ihl i sur. 2000; Rosen i sur. 1984; Weyer i sur. 1997). Skala se sastoji od 11 stavki koje se boduju bodovima od 0 do 5 s obzirom na razinu oštećenja (0 označava da nema oštećenja, a 5 najveći stupanj oštećenja). Ukupni broj bodova na podskali ADAS-Cog kreće se u rasponu od 0 do 70 gdje, suprotno nego u slučaju testa MMSE, veći broj bodova (≥ 18) ukazuje na značajnije kognitivno oštećenje. Test ukupno traje oko 30 minuta.

Stavke podskale ADAS-Cog koje se testiraju su:

- prisjećanje riječi (0-10 bodova),
- imenovanje (0-5 bodova),

- izvršavanje naredbi (0-5 bodova),
- konstrukcijska praksa tj. crtanje figura (0-5 bodova),
- idejna praksa (0-5 bodova),
- orijentacija (0-8 bodova),
- prepoznavanje riječi (0-12 bodova),
- govor (0-5 bodova),
- razumijevanje govora (0-5 bodova),
- problem u nalaženju riječi (0-5 bodova),
- pamćenje uputa testa (0-5 bodova).

3.1.3 Etički aspekt istraživanja

Svim ispitanicima ili njihovim skrbnicima u detalje je objašnjena svrha i postupak istraživanja te se uzorkovanje vršilo tek nakon što su ispitanici ili njihovi skrbnici dobrovoljno potpisali informirani pristanak. Sva istraživanja su provedena uz odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Zagreb i uz potpunu suradnju i primjereno razumijevanje sudionika. Istraživanja su bila potpuno usklađena s etičkim standardima postavljenim Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine.

3.2 Izolacija DNA iz krvi

U bolnici je ispitanicima uzeto 8 ml uzorka krvi u plastične šprice s 2 ml antikoagulantne otopine ACD (engl. *acid citrate dextrose*), a svi uzorci su se potom prebacili u plastične epruvete i pohranili u hladnjak na -20°C. Millerovom metodom izoliranja (Miller i sur. 1998) izolirana je genomska DNA iz leukocita. Popis korištenih kemikalija prikazan je u tablici 1.

Uzorci krvi se odmrznu te se stave miješati na valjkastu miješalicu tijekom 20 minuta. U sterilnu Eppendorf epruvetu izdvoji se 300 µl uzorka uz dodatak 900 µl hladnog pufera za lizu eritrocita (RCLB, engl. *Red cell lysis buffer*), te se sadržaj potom promiješa na rotacijskoj miješalici i ostavi stajati na ledu 10 minuta. Lizirani eritrociti se uklanjaju centrifugiranjem (2 min. na 13 400 x g, pri 4°C) prilikom kojeg oni ostaju u supernatantu koji se baca. U talogu se nalaze leukociti koji se pročišćavaju 3 puta ponavljanjem postupka resuspendiranja u RCLB, te centrifugiranja uz odvajanje supernatanta. Nakon toga, na talog se dodaje 300 µl natrij-EDTA pufera, 30 µl 10% SDS-a kako bi se destabilizirale membrane leukocita i 1.5 µl proteinaze K kako bi se razgradili proteini. Sve se lagano promiješa i ostavi inkubirati 2 sata na 56°C, uz miješanje na miješalici.

Nakon inkubacije uzorci se ohlade na sobnu temperaturu (25°C), te im se doda 160 µl 5 mM NaCl, promiješa na rotacijskoj miješalici i potom centrifugira (5 min. na 13 400 x g, pri 20°C). Supernatant koji sadrži DNA se prelije u novu mikroepruvetu, te mu se doda 800 µl hladnog izopropanola koji uz lagano miješanje uzrokuje precipitaciju DNA, pa ona postaje vidljiva u obliku bjelkastih niti. Uzorak se centrifugira (2 min. na 12 000 x g, pri 20°C), supernatant se odlije, a u talog se doda 250 µl 75% etanola. Slijedi posljednje centrifugiranje (2 min. na 12 000 x g, pri 20°C) nakon kojeg se supernatant odlije, a talog se ostavi sušiti na zraku 30 minuta, kako bi sav alkohol ishlapio. Konačno se talogu dodaje 100 µl Tris-EDTA pufera, koji uz protresanje tijekom jednog sata na 37°C otapa izoliranu DNA. Uzorci se potom pohranjuju u hladnjak na -4°C.

Tablica 1. Kemikalije za izolaciju DNA metodom isoljavanja

Kemikalije	Volumen po 1 epruveti
Pufer za lizu eritrocita (RCLB, engl. Red cell lysis buffer), 10 mM Tris, 5 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, pH=7.6	900 µl
Natrij-EDTA pufer (SE-buffer, engl. Sodium EDTA), 75 mM NaCl, 25 mM Na ₂ EDTA, pH=8.0	300 µl
Natrij dodecil sulfat (SDS, engl. Sodium dodecil sulphate), 10%, pH=7.2	30 µl
Proteinaza K (20 mg/kg)	1.5 µl
NaCl, 5 mM	160 µl
Izopropanol	800 µl
Etanol, 75%	250 µl
Tris-EDTA pufer (TE-buffer), 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8.0	100 µl

3.3 Određivanje genotipova

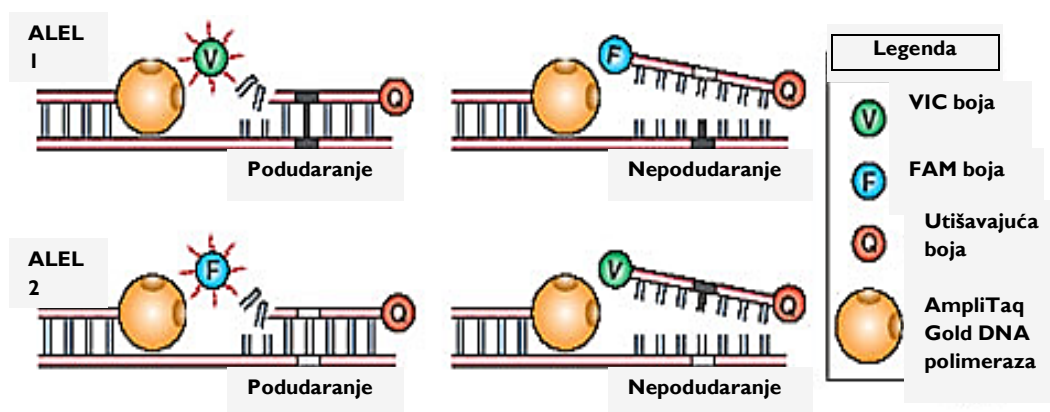
Uređaj „ABI Prism 7000 Sequencing detection System apparatus“ (ABI, Foster City, SAD) korišten je prema protokolu proizvođača *Applied Biosystems* za detekciju C ili T baze u polimorfizmu C267T (rs1805054) u genu *HTR6*, koji kodira za serotoninški receptor 5-HT₆,

smještenom na kromosomu 1p35-p36. Prema protokolu proizvođača koristile su se predizajnirane Taqman početnice i probe (engl. *Taqman SNP genotyping assay*).

Ciljana sekvenca DNA koja se umnažala bila je:

CGCCGGCCATGCTGAACGCGCTGTA[C/T]GGGCGCTGGGTGCTGGCGCGCGGCC.

Metoda alelna diskriminacije posredstvom 5' nukleazne reakcije (Slika 10.) korištena je za detekciju polimorfizama s jednom promijenjenom bazom (SNP, engl. *Single nucleotide polymorphism*) (Holland i sur. 1991). Metoda se zasniva na primjeni posebno dizajniranih fluorogenih proba koje se vežu uz određeni alel i mogu se detektirati prilikom umnažanja DNA u lančanoj reakciji polimeraze (PCR, engl. *Polymerase chain reaction*). Proba se sastoji od jednolančanog oligonukleotida na čijem se 5' kraju nalazi vezana fluorescentna boja (engl. *reporter*), a na 3' kraju prigušavajuća boja (engl. *quencher*) koja smanjuje fluorescencijski signal energetskim transferom Förster-tipa (FRET, engl. *Förster-type energy transfer*). Ukoliko je proba komplementarna DNA sekvenci, dolazi do njihove hibridizacije pa tijekom PCR reakcije Taq DNA polimeraza svojom 5' nukleaznom aktivnošću oslobađa fluorescentnu boju sa probe što ABI Prism uređaj detektira kao povećanje u intenzitetu fluorescencije. Tako se nastajanje PCR produkta u realnom vremenu (engl. *Real-time PCR*) prati mjereći povećanje fluorescencije u svakom ciklusu umnažanja.



Slika 10. Alelna diskriminacija putem 5' nukleazne reakcije uz korištenje dviju proba označenih fluorescentnim bojama VIC i FAM (slika preuzeta sa Nemoursresearch.org/cores/bcl/techniques.html)

Osnovni sastojci potrebni za PCR reakciju i genotipizaciju su uzorak izolirane DNA, kombinacija dviju početnica za umnažanje ciljane sekvence DNA, slobodni deoksiribonukleotid trifosfati, AmpliTaq Gold DNA polimeraza i dvije različito obilježene Taqman MGB (engl. *minor groove binding*) probe za razlikovanje dva alela. DNA probe s konjugiranim MGB grupama stvaraju iznimno stabilne duplekse s jednolančanim uzorkom DNA, imaju višu temperaturu taljenja (T_m) i povećanu specifičnost za komplementarnu

sekvencu što omogućuje korištenje kraćih proba i sprječavanje nespecifičnog vezanja (Kutyavin i sur. 2000). U ovom istraživanju korištene su dvije probe specifične za C ili T alel rs1805054 polimorfizma u genu za serotoninški receptor 5-HT₆, obilježene različitim fluorescentnim bojama VIC i FAM, gdje značajno povećanje fluorescencije u jednoj boji upućuje na homozigotnost, a povećanje u obje boje na heterozigotnost genotipizirane osobe.

Postupak genotipizacije: Uzorak izolirane DNA se odmrzne i pripreme se razrjeđenja sa destiliranom vodom kako bi se u konačnici dobilo 1-20 ng DNA nakon reakcije. U PCR reakcijske pločice odpipetira se 4.5 µl razrijeđenog uzorka DNA i 5.5 µl reakcijske otopine koja se sastoji od Taqman univerzalne mješavine i Taqman mješavine za genotipizaciju SNP-a (Tablica 2). Reakcijske pločice se potom zatvore folijom, centrifugiraju 2 min. na 5000 rpm i stave u Real-time PCR uređaj “*ABI Prism 7000 Sequencing Detection System apparatus*”. Uređaj u početnom koraku zagrijava pločice 10 minuta na 95°C, zatim 15 sekundi na 92°C kako bi došlo do denaturacije DNA, te potom spušta temperaturu na 60°C kroz 1 minutu, radi vezivanja početnica i elongacije AmpliTaq Gold polimerazom. Ciklusi od denaturacije do umnažanja DNA se ponavljaju 40 puta.

Tablica 2. Kemikalije korištene za genotipizaciju polimorfizma

Kemikalije	Volumen po 1 jažici
Genomska DNA razrijeđena u dH ₂ O (1-20 ng DNA)	4.5 µl
Taqman univerzalna mješavina	5 µl
40x Taqman mješavina za genotipizaciju SNP-a	0.5 µl
Ukupni volumen	10 µl

3.4 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program «*GraphPad Prism version 4.00 for Windows*» (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Skupine ispitanika uspoređivane su prema dobi i bodovima ocjenskih ljestvica (izraženih kao srednja vrijednost ± standardna pogreška) primjenom jednostruke analize varijance (ANOVA) popraćene Tukey-evim testom multiple komparacije. Značajnost odstupanja dobivene raspodjele genotipova od očekivane (Hardy-Weinbergova raspodjela) kao i razlike u raspodjeli genotipova i alela istraživanog polimorfizma između različitih skupina određivale su se primjenom χ^2 test-a. Statistički značajnim smatrane su one razlike kod kojih je vjerojatnost p bila manja od 0.05.

4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno ukupno 214 ispitanika (101 muškaraca i 113 žena). Kod 115 ispitanika postavljena je dijagnoza Alzheimerove bolesti (AB), kod 55 dijagnoza blagog kognitivnog poremećaja (MCI), a 44 ispitanika imalo je dijagnozu ostalih tipova demencije: 11 vaskularne demencije (VaD), 26 frontotemporalne demencije (FTD) i 7 demencije s Lewyjevim tjelešcima (DLB) (Tablica 3). Zbog malog broja oboljelih od ostalih demencija, ispitanici oboljeli od vaskularne demencije, frontotemporalne demencije i demencije s Lewyjevim tjelešcima svrstani su zajedno u skupinu ostale demencije. Srednja vrijednost \pm pogreška dobi ispitanika oboljelih od AB bila je $71,83 \pm 0,79$, ispitanika oboljelih od MCI bila je $67,63 \pm 1,68$, a ispitanika oboljelih od ostalih demencija bila je $65,72 \pm 1,46$, pri čemu su ispitanici oboljeli od AB bili značajno stariji od ispitanika sa ostalim demencijama ($p < 0.05$ prema MCI; $p < 0.01$ prema ostalim demencijama) (Tablica 3).

Tablica 3. Broj i postotak ispitanika sa različitim dijagnozama demencije uključenih u istraživanje, te njihova dob

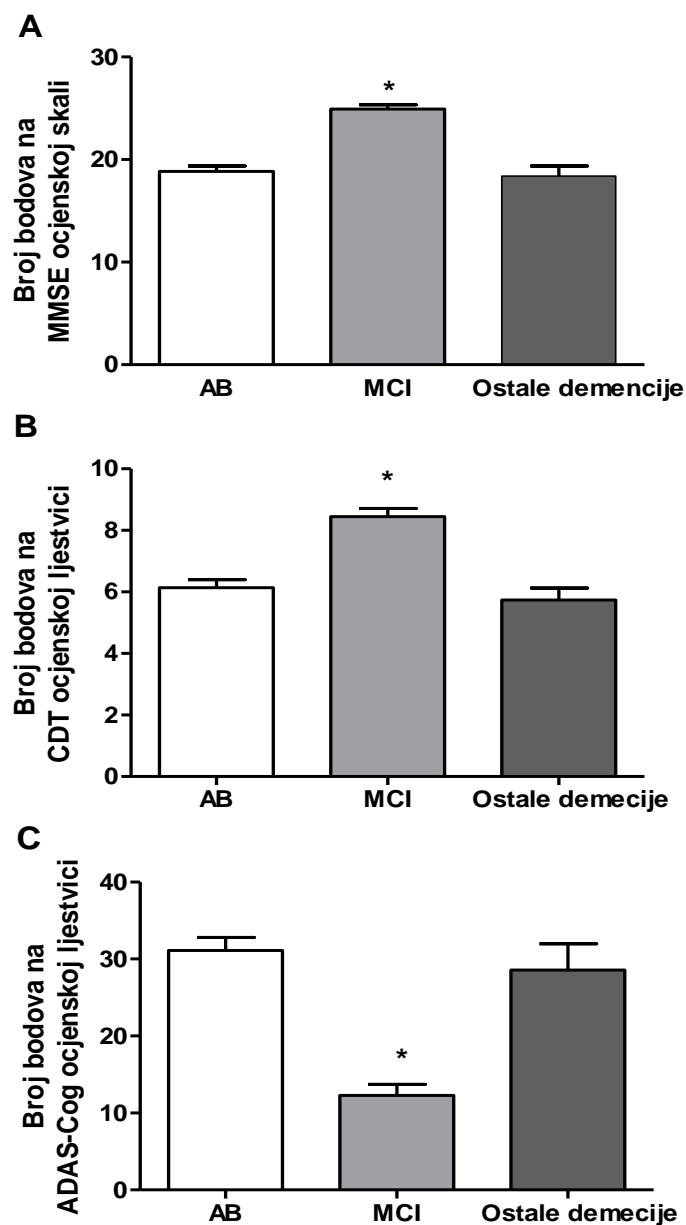
Demencija	AB	MCI	VaD	FTD	DLB
N	115	55	11	26	7
(%)	(53.74%)	(25.70%)	(5.11%)	(12.15%)	(3.27%)
Dob	$71,83 \pm 0,79^*$	$67,63 \pm 1,68$	$65,72 \pm 1,46$		

* $p < 0.05$ prema MCI; $p < 0.01$ prema ostalim demencijama

U ispitanika oboljelih od demencije kognitivna oštećenja procjenjivana su testom procjene mentalnog stanja (MMSE, engl. *Mini-mental state examination*), testom crtanja sata (CDT, engl. *Clock drawing test*) i skalom procjene Alzheimerove bolesti (ADAS, engl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale*) - kognitivna podskala (ADAS-Cog). Broj bodova na navedenim ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema tipu demencije.

Kao što je i očekivano 3 skupine osoba s demencijama (Alzheimerovom bolešću, blagim kognitivnim poremećajem i ostalim demencijama), značajno su se razlikovale u broju bodova na MMSE ocjenskoj ljestvici ($F(2,179) = 28,70$, $p < 0.0001$, ANOVA), pri čemu je skupina osoba s blagim kognitivnim poremećajem imala značajno veći broj bodova na MMSE ocjenskoj ljestvici od osoba sa Alzheimerovom bolešću i ostalim demencijama ($p < 0.001$, Tukey-ev test višestruke komparacije) (Tablica 4, Slika 11A).

Nadalje, spomenute 3 skupine osoba s demencijama, značajno su se razlikovale i u broju bodova na CDT ocjenskoj ljestvici ($F(2,180) = 20,49$, $p < 0.0001$, ANOVA), pri čemu je ponovno skupina osoba s blagim kognitivnim poremećajem imala značajno veći broj bodova ($p < 0.001$, Tukey-ev test višestruke komparacije) od osoba sa Alzheimerovom bolešću i ostalim demencijama (Tablica 4, Slika 11B).



* $p < 0.001$, Tukey-ev test višestruke komparacije

Slika 11. Broj bodova na MMSE, CDT i ADAS-Cog ocjenskim ljestvicama u ispitanika s različitim tipovima demencije

(AB-Alzheimerova bolest, MCI-blagi kognitivni poremećaj, Ostale demencije: vaskularna demencija, frontotemporalna demencija i demencija s Lewyjevim tjelešcima)

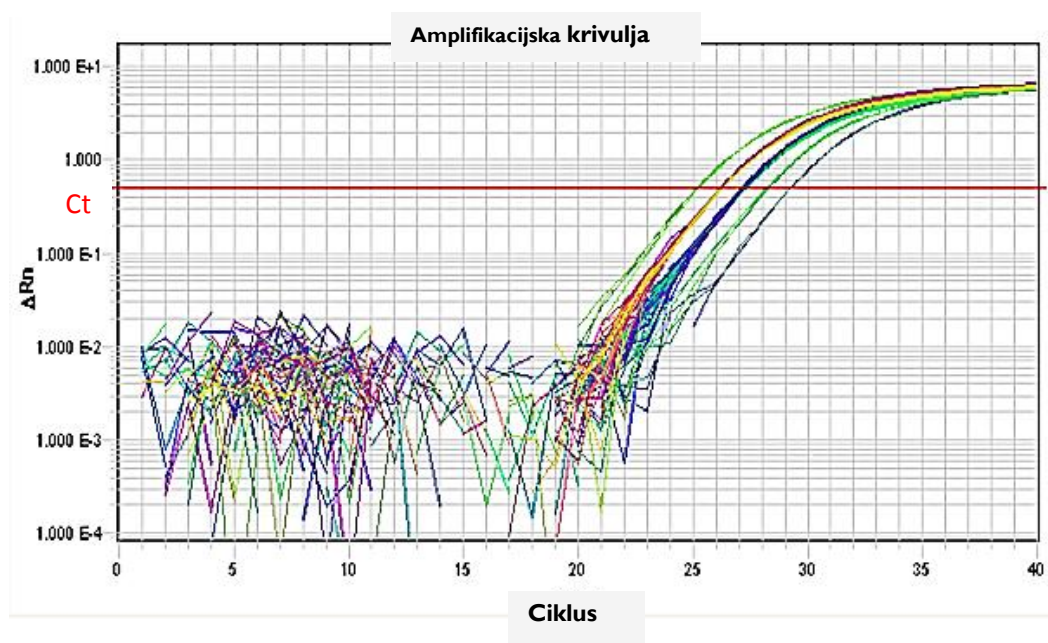
Kao što je prikazano u tablici 4 i na slici 11C, u slučaju ADAS-Cog ocjenske skale, postojale su značajne razlike u broju bodova između skupine osoba s Alzheimerovom bolešću, blagim kognitivnim poremećajem i ostalim demencijama ($F(2,149) = 19,34$, $p < 0.0001$, ANOVA). Međutim, kako na ADAS-Cog ocjenskoj ljestvici veći broj bodova ukazuje na značajnije kognitivno oštećenje, nije iznenađujuće da je u ovom slučaju skupina osoba s blagim kognitivnim poremećajem imala značajno manji broj bodova ($p < 0.001$, Tukey-ev test višestruke komparacije) od osoba sa Alzheimerovom bolešću i ostalim demencijama.

Tablica 4. Broj bodova na MMSE, CDT i ADAS-Cog ocjenskim ljestvicama u ispitanika s različitim tipovima demencije

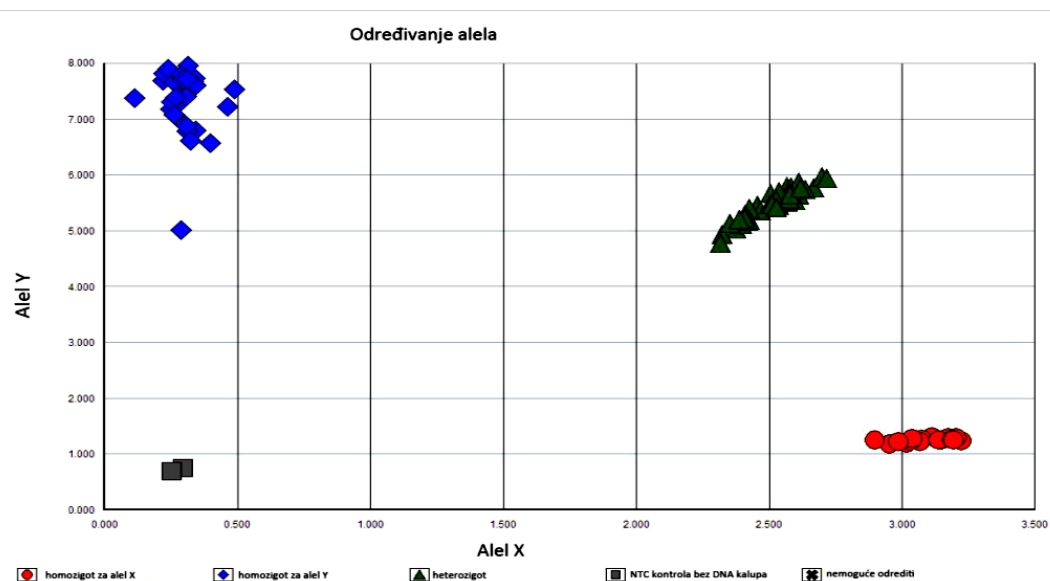
Demencija	AB	MCI	Ostale demencije
MMSE bodovi	$18,83 \pm 0,53$	$24,92 \pm 0,42^*$	$18,38 \pm 0,99$
CDT bodovi	$6,14 \pm 0,26$	$8,45 \pm 0,26^*$	$5,74 \pm 0,39$
ADAS-Cog bodovi	$31,11 \pm 1,70$	$12,30 \pm 1,42^*$	$28,59 \pm 3,40$

* $p < 0.001$ prema ostalim skupinama, Tukey-ev test višestruke komparacije

Uzorci DNA izolirani iz krvi svih ispitanika podvrgnuti su genotipizaciji polimorfizma C267T (rs1805054) u genu za serotonininski receptor 5-HT₆ putem real-time PCR metode. Reprezentativni primjer PCR amplifikacijskih krivulja prikazan je na slici 12, a primjer genotipizacije (alelne diskriminacije) na slici 13. Kao što je prikazano u tablici 5, frekvencije opaženih genotipova polimorfizma rs1805054 u bolesnika oboljelih od demencije bile su skladu s Hardy-Weinbergovom (HW) ravnotežom.



Slika 12. Primjer prikaza amplifikacijskih krivulja (izvorna slika) Prilikom svakog ciklusa umnažanja DNA, ABI Prism uređaj očitava povećanje u intenzitetu emitirane fluorescencije koja nastaje otpuštanjem fluorescentnih boja sa vezanih proba. Očitana fluorescencija grafički se prikazuje u obliku amplifikacijske krivulje te ukoliko prelazi određeni prag detekcije, predstavlja dokaz uspješnog umnažanja određene sekvence DNA. Značajno povećanje fluorescencije u jednoj boji upućuje na homozigotnost, a povećanje u obje boje na heterozigotnost uzorka.



Slika 13. Primjer prikaza rezultata genotipizacije SNP-ova (izvorna slika)
 Analizom amplifikacijskih krivulja, posebni program ABI Prism uređaja grupira uzorke u koordinatnom sustavu uz os x, y ili na sredini između te dvije osi, upućujući da se radi o homozigotnom odnosno heterozigotnom uzorku.

Tablica 5. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma rs1805054

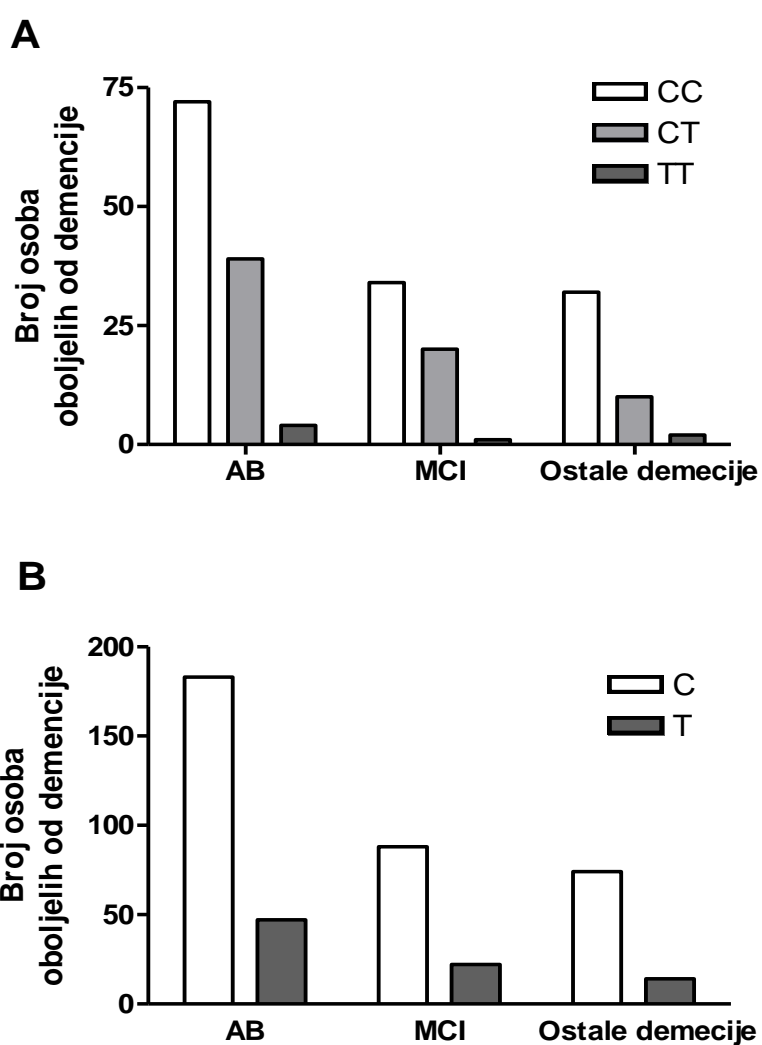
Genotipovi		CC	CT	TT
p = 0.647	Dobiveno	138 (64.49%)	69 (32.24%)	7 (3.27%)
	Očekivano	139.0 (64.95%)	66.9 (31.26%)	8.0 (3.74%)

*ukoliko je $p < 0.05$ rezultat nije u skladu sa HW ravnotežom

Kao što je prikazano u tablici 6 i na slici 14, u ispitanika podijeljenih prema vrsti demencije, na bolesnike sa Alzheimerovom bolesti (AB), blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i sa ostalim tipovima demencije (vaskularnom demencijom, frontotemporalnom demencijom i demencijom s Lewyjevim tjelešcima (DLB)) nisu utvrđene značajne razlike u raspodjeli genotipova ($\chi^2 = 2.800$, $df = 4$, $p = 0.592$) (Slika 14A) i alela ($\chi^2 = 0.869$, $df = 2$, $p = 0.648$) (Slika 14B) polimorfizma rs1805054 gena *HTR6*.

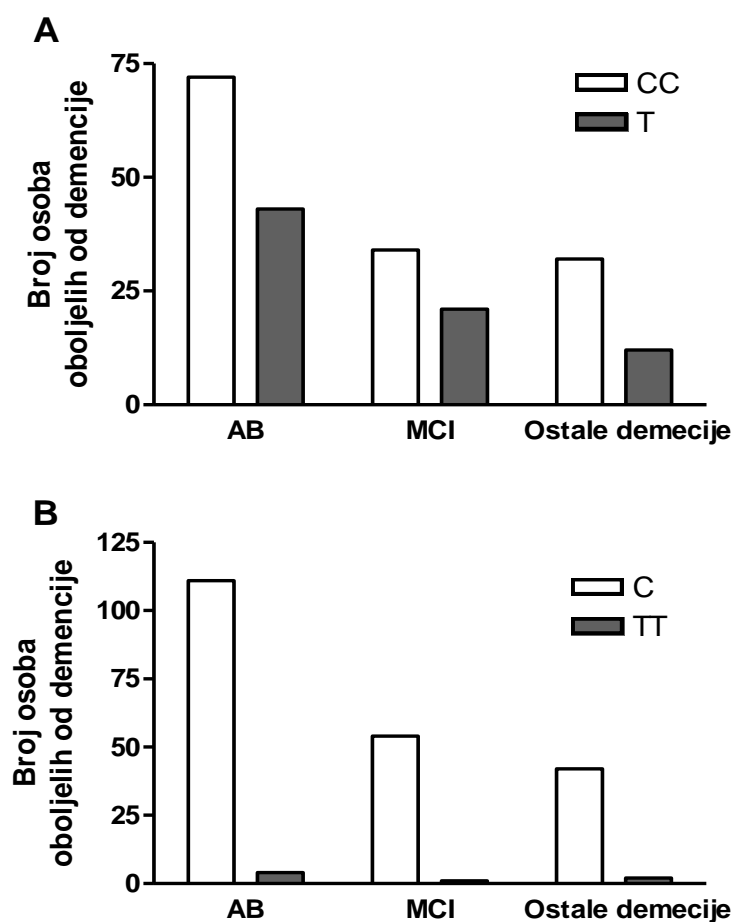
Tablica 6. Raspodjela genotipova i alela u ispitanika oboljelih od demencije podijeljenih prema tipu demencije

Genotipovi	CC	CT	TT	C	T
Alzheimerova bolest	72	39	4	183	47
Blagi kognitivni poremećaj	34	20	1	88	22
Ostale demencije	32	10	2	74	14



Slika 14. A) Raspodjela genotipova i B) alela u ispitanika oboljelih od demencije podijeljenih prema tipu demencije (AB-Alzheimerova bolest, MCI-blagi kognitivni poremećaj, Ostale demencije- vaskularna demencija, frontotemporalna demencija i demencija s Lewyjevim tjelešcima)

Između ispitanika sa Alzheimerovom bolešću (AB), blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ostalim tipovima demencije, nisu utvrđene statistički značajne razlike u frekvenciji nosioca homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela T (CT+TT) ($\chi^2 = 1.653$, $df = 2$, $p = 0,438$), kao niti u učestalosti nosioca homozigotnog genotipa TT naspram nosioca alela C (CT+CC) ($\chi^2 = 0.608$, $df = 2$, $p = 0,738$) (Tablica 7, Slika 15).



Slika 15. Ispitanici oboljeli od različitih tipova demencije podijeljeni na A) nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T, odnosno B) na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C

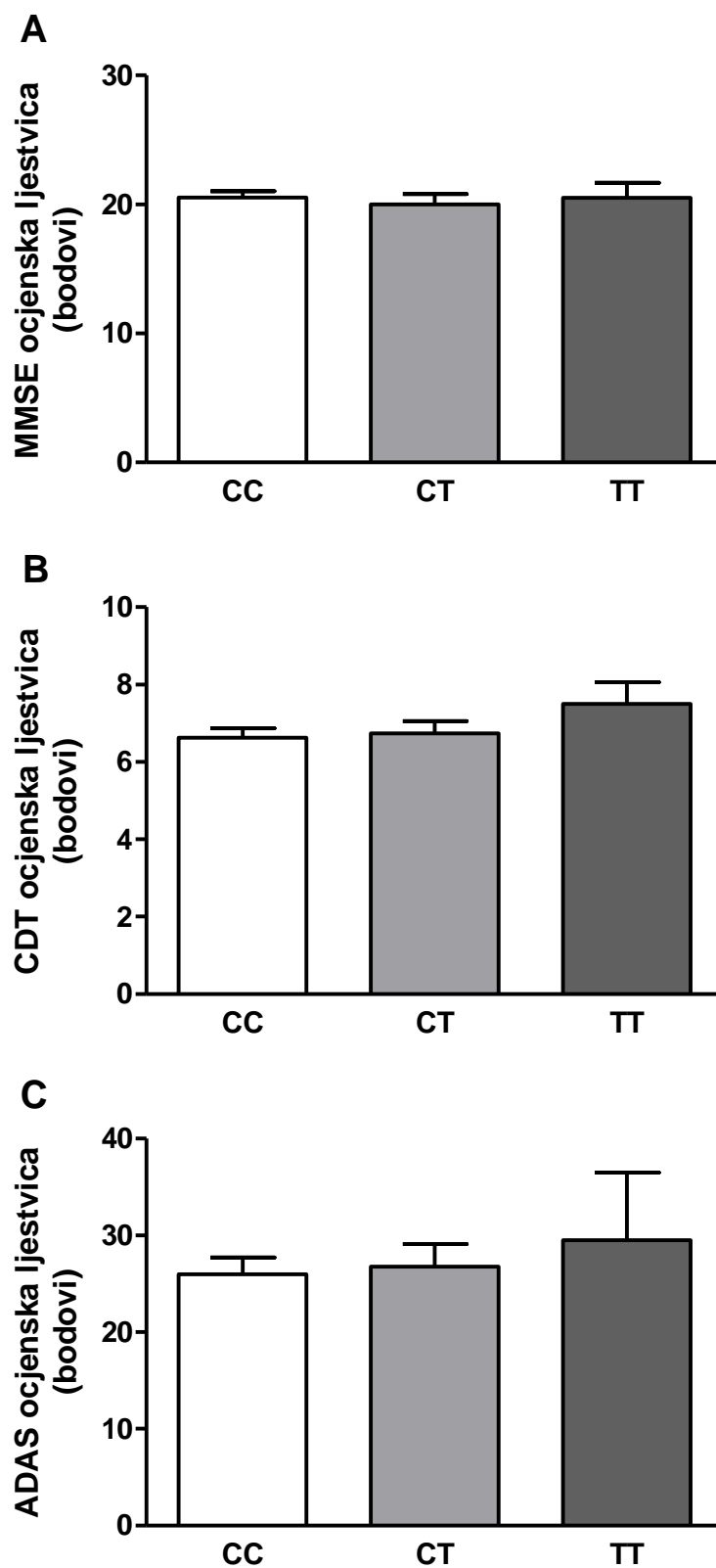
Tablica 7. Ispitanici oboljeli od različitih tipova demencije podijeljeni na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T, odnosno na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C

Genotipovi	CC	T	TT	C
Alzheimerova bolest	72	43	4	111
Blagi kognitivni poremećaj	34	21	1	53
Ostale demencije	32	12	2	42

Broj bodova na MMSE, CDT i ADAS-Cog ocjenskim skalama uspoređen je u svih ispitanika podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs1805054 u genu *HTR6*, koji kodira za serotoninški receptor 5-HT6. Kao što je prikazano u tablici 8 i na slici 16, analiza varijance (ANOVA) nije utvrdila nikakve značajne razlike između ispitanika oboljelih od demencije podijeljenih prema genotipu, u broju bodova na MMSE ocjenskoj ljestvici ($F(2,179) = 0,1918$, $p = 0,826$), CDT ocjenskoj ljestvici ($F(2,180) = 0,348$, $p = 0,707$) i ADAS-Cog ocjenskoj ljestvici ($F(2,149) = 0,125$, $p = 0,882$).

Tablica 8. Broj bodova na MMSE, CDT i ADAS-Cog ocjenskim skalama u svih ispitanika podijeljenih prema genotipu

Genotipovi	CC	CT	TT
MMSE bodovi	20,55 ± 0,50	20,00 ± 0,80	20,50 ± 1,18
CDT bodovi	6,63 ± 0,25	6,74 ± 0,32	7,50 ± 0,56
ADAS-Cog bodovi	25,97 ± 1,75	26,77 ± 2,35	29,51 ± 7,01



Slika 16. Broj bodova na ocjenskoj ljestvici A) MMSE, B) CDT i C) ADAS-Cog u svih ispitanika oboljelih od demencije, podijeljenih prema genotipu

5. RASPRAVA

Demencija je sindrom globalnog i progresivnog oštećenja stečenih kognitivnih sposobnosti pri očuvanoj svijesti koja u konačnici dovodi do nesposobnosti bolesnika da brine sam o sebi, te stavlja veliki emocionalni i ekonomski pritisak na obitelj i zdravstveni sustav. Zbog rastućeg broja progresivnih demencija u svijetu te nemogućnosti njihovog izlječenja ili značajnog usporavanja tijeka bolesti, provode se brojna istraživanja koja pokušavaju obuhvatiti ovu bolest iz različitih znanstvenih aspekata, od utvrđivanja rizika i ranog otkrivanja, do pronalaženja novih potencijalnih meta za lijekove. Iako postoje obiteljski slučajevi gdje su točno poznate mutacije u genima koje uzrokuju demenciju, većina slučajeva je sporadična i pretpostavlja se da nastaju kao posljedica međudjelovanja okolišnih čimbenika i genetske predispozicije. Genetske predispozicije za sporadičnu demenciju još uvijek nisu posve poznate, ali se pretpostavlja da se temelje na prisutnosti određenih alela polimorfnih gena uključenih u kognitivne procese (WHO 2015).

Otkako je otkriveno da se različite vrste serotoninских receptora nalaze u područjima mozga ključnim za kogniciju (Hoyer 1986), provela su se brojna istraživanja kojima je pokušano dokazati njihova konkretna uloga u učenju i prizivanju pamćenja. Istraživanja nisu dala jednoznačne rezultate zbog različitih odgovora serotoninских receptora na agoniste i antagoniste, ali su ipak potvrdila kompleksnu fiziološku, patofiziološku i terapijsku ulogu 5-HT sustava u kognitivnim procesima (Meneses 1998).

Posljednji otkriveni tip serotoninских receptora je receptor 5-HT₆ zbog čega je trenutno jedan od najatraktivnijih predmeta istraživanja. Specifična raspodjela ovog receptora, kao i njegov visoki afinitet za antipsihotike uputili su na istraživanje njegove uloge u psihijatrijskim slučajevima. Shinkai i suradnici su 1999. godine pokušali povezati bialelni polimorfizam C267T gena za receptor 5-HT₆ sa shizofrenijom u populaciji Japanaca, no u učestalosti alela između zdrave kontrole i pacijenata sa shizofrenijom nije bilo značajne razlike (Shinkai i sur. 1999). Ovakav rezultat uputio je na zaključak kako ovaj polimorfizam nema ulogu u nastanku shizofrenije. Yu i suradnici su nakon toga pristupili novom istraživanju uloge polimorfizma C267T, ali iz drugog kuta gdje su proučavali povezanost polimorfizma i kliničkog odgovora pacijenata s shizofrenijom koji su bili otporni na tipične antipsihotike. Grupa od 99 pacijenata kineskog porijekla bila je genotipizirana za polimorfizam C267T, te joj je kroz osam tjedana praćen odgovor na atipični antipsihotik klopazin. Raspodjela sva tri moguća genotipa odgovarala je Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.

Utvrđeno je da su pacijenti sa 267T/T genotipom imali značajno bolji odgovor na klopazin po BPRS testu, a i pozitivne promjene ove grupe u općim simptomima bile su blizu statistički značajnoj vrijednosti (Yu i sur. 1999). Tim rezultatima dokazana je važnost ovog polimorfizma u kognitivnim simptomima shizofrenije što je stvorilo poticaj za istraživanje njegove uloge u drugim kognitivnim poremećajima.

Budući da je serotonergička disfunkcija povezana s patogeneзом demencija, Tsai i suradnici su 1999. godine započeli s istraživanjem uloge polimorfizma C267T gena *HTR6* u razvoju Alzheimerove bolesti. Ispitali su uzorke krvi 92 pacijenta s Alzheimerovom bolesti i 104 zdrave kontrole. Svi ispitanici su bili kineskog porijekla s Tajvana, te stariji od 65 godina. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u raspodjeli genotipova i alela pacijenata s AB u odnosu na zdrave kontrole. Kod pacijenata s AB prevladavao je genotip C/C (57.6%), a kod kontrolne grupe C/T (58.7%) čime je dokazano da homozigoti s alelom 267C imaju povećan rizik od AB. Budući da je C267T tiha mutacija koja se nalazi u intronu glasničke RNA (mRNA) i koja ne mijenja aminokiseline u konačnom proteinu, utjecaj ovog polimorfizma na AB mogao bi se objasniti promjenom sekundarne strukture i stabilnosti mRNA ili neravnotežom vezanja (engl. linkage disequilibrium) s nekim drugim genom čiji se utjecaj zapravo očituje u nastanku bolesti (Tsai i sur. 1999).

Kan i suradnici su u svojem istraživanju 2004. godine potvrdili ulogu polimorfizma C267T gena *HTR6* u razvoju kasne sporadične Alzheimerove bolesti u populaciji iz kopnenog dijela Kine. Istraživanje je provedeno na grupi od 105 pacijenata s AB i grupi od 130 zdravih kontrola. U njihovom slučaju je kod obje grupe prevladavao genotip C/C, ali je grupa pacijenata s AB imala statistički značajno veći udio genotipa C/T u odnosu na kontrolu. Budući da su ovi rezultati vrlo različiti od rezultata koje su dobili Tsai i suradnici, Kan i suradnici su primijetili da se rezultati istraživanja iz 1999. godine ne poklapaju s HW ravnotežom kako su autori tvrdili. Zbog takve nedosljednosti, potrebna su dodatna razamtranja Tsaijevih rezultata (Kan i sur. 2004).

Istraživanja uloge polimorfizma C267T u nastanku Alzheimerove bolesti provedena su i u nekim europskim zemljama: Njemačkoj (Thome i sur. 2001), Italiji (Orlacchio i sur. 2002) i Španjolskoj (Alvarez-Alvarez i sur. 2003). Nijedno od ovih istraživanja nije dalo statistički značajne rezultate u raspodjeli genotipova i alela u pacijenata s AB, a zamijećena je i različita učestalost genotipova u kontrolnim grupama između Njemačke, Kine i Italije. To upućuje na moguće značajno variranje učestalosti polimorfizma C267T u etnički različitim grupama.

Nedostatak povezanosti polimorfizma C267T s AB može biti posljedica prikrivanja povezanosti zbog heterogenosti uzorka ili se zbog etničkih razlika u bijeloj europskoj rasi doista ne može pronaći povezanost.

Kako bi vidjeli slijedi li i Hrvatska trend europskih istraživanja, ispitanike s AB, MCI, FTD, VaD i DLB podijelili smo na tri grupe AB, MCI i ostale demencije, te smo analizirali polimorfizam C267T gena *HTR6*. U našem istraživanju pacijenti s AB bili su statistički značajno stariji od ispitanika s ostalim demencijama kao što je bilo i očekivano. Pacijenti s MCI imali su značajno veći broj bodova na MMSE i CDT testovima, dok su na ADAS-Cog testu imali značajno manji broj bodova što je također bilo očekivano s obzirom na njihovu kliničku dijagnozu s boljim kognitivnim stanjem od ostalih grupa.

Raspodjela sva tri moguća genotipa bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom. Statistička analiza nije pokazala značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela između AB, MCI i ostalih demencija, što je skladu s rezultatima ostalih europskih istraživanja polimorfizma C267T. Također nije bilo značajne razlike u učestalosti nosioca homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela T (CT+TT), niti u učestalosti nosioca homozigotnog genotipa TT naspram nosioca alela C (CT+CC). Usporedba genotipa s rezultatima na MMSE, CDT, ADAS-Cog testovima također nije dala statistički značajne rezultate.

Naši rezultati upućuju na zaključak kako u hrvatskoj populaciji polimorfizam C267T u genu *HTR6* nema značajan utjecaj na nastanak AB, MCI i drugih demencija, niti na uspješnost rješavanja kognitivnih testova za uspostavljanje kliničke dijagnoze demencija. Razlog možda leži u relativno malom broju pacijenata sa demencijom, čije uzorke i detaljne analize kognitivnih testova je vrlo teško prikupiti. Međutim, također postoji mogućnost da ovaj polimorfizam ne predstavlja genetički čimbenik rizika za nastanak bolesti, ali utječe na druge aspekte demencije i poremećaje raspoloženja poput trajanja bolesti i učinkovitosti tretmana lijekovima, što se također treba ispitati. Osim ovog, poželjne su i analize drugih polimorfizama i mutacija gena *HTR6* i njegovog promotora kako bi se u potpunosti istražila njegova uloga u AB i drugim demencijama.

Nadalje, različiti rezultati azijskih i europskih istraživanja upućuju na veliku etničku raznolikost u učestalosti ovog polimorfizma i u njegovoj povezanosti s AB. Kako bi se potvrdila teorija da povezanost polimorfizma C267T s AB postoji, ali samo u nekim etničkim grupama, potrebno je ponoviti dosadašnju studiju s većim brojem pacijenata i usporediti je s rezultatima drugih azijskih populacija poput Japanaca.

6. ZAKLJUČAK

U 53.74% ispitanika uključenih u istraživanje postavljena je dijagnoza Alzheimerove bolesti (AB), u 25.70% ispitanika dijagnoza blagog kognitivnog poremećaja (MCI), u 5.11% ispitanika dijagnoza vaskularne demencije (VaD), u 12.15% ispitanika dijagnoza frontotemporalne demencije (FTD), te u 3.27% ispitanika dijagnoza demencije s Lewyjevim tjelešcima (DLB)

1. Skupine osoba s Alzheimerovom bolešću, blagim kognitivnim poremećajem i ostalim demencijama, značajno su se razlikovale u broju bodova na MMSE ocjenskoj ljestvici, pri čemu je skupina osoba s blagim kognitivnim poremećajem imala značajno veći broj bodova na MMSE ocjenskoj ljestvici od osoba sa Alzheimerovom bolešću i ostalim demencijama.
2. Skupine osoba s demencijama (AB, MCI i ostale demencije), značajno su se razlikovale i u broju bodova na CDT ocjenskoj ljestvici, pri čemu je ponovno skupina osoba s blagim kognitivnim poremećajem imala značajno veći broj bodova od osoba sa Alzheimerovom bolešću i ostalim demencijama.
3. U slučaju ADAS-Cog ocjenske skale, postojale su značajne razlike u broju bodova između skupine osoba s Alzheimerovom bolešću, blagim kognitivnim poremećajem i ostalim demencijama. Međutim, kako na ADAS-Cog ocjenskoj ljestvici veći broj bodova ukazuje na značajnije kognitivno oštećenje, u ovom je slučaju skupina osoba s blagim kognitivnim poremećajem imala značajno manji broj bodova od osoba sa Alzheimerovom bolešću i ostalim demencijama.
4. Učestalosti utvrđenih genotipova polimorfizma rs1805054 gena *HTR6*, koji kodira za serotoninški receptor 5-HT₆, u bolesnika oboljelih od demencije bile su skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.
5. U ispitanika podijeljenih prema vrsti demencije, na bolesnike sa Alzheimerovom bolesti, blagim kognitivnim poremećajem i sa ostalim tipovima demencije (vaskularnom demencijom, frontotemporalnom demencijom i demencijom sa Lewyjevim tjelešcima) nisu utvrđene značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela polimorfizma rs1805054 gena *HTR6*.
6. Između ispitanika sa AB, MCI i ostalim tipovima demencije, nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti nosioca homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela T (CT+TT), kao niti u učestalosti nosioca homozigotnog genotipa TT naspram nosioca alela C (CT+CC).

7. Statistička analiza nije utvrdila nikakve značajne razlike između svih ispitanika oboljelih od demencije podijeljenih prema genotipu, u broju bodova na MMSE ocjenskoj ljestvici, CDT ocjenskoj ljestvici i ADAS-Cog ocjenskoj ljestvici.
8. Rezultati našeg istraživanja nisu uputili na povezanost polimorfizma rs1805054 gena *HTR6*, koji kodira za serotonininski receptor 5-HT₆, sa razvojem demencije u bolesnika sa blagim kognitivnim poremećajem, Alzheimerovom bolesti i ostalim oblicima demencija poput vaskularne demencije, frontotemporalne demencije i demencije sa Lewyjevim tjelešcima.
9. U svrhu razjašnjavanja uloge gena *HTR6*, koji kodira za serotonininski 5-HT₆ receptor, u razvoju demencije, potrebna su daljnja opširnija istraživanja koje će uključiti različite populacije, različite tipove demencija i veći broj ispitanika.

7. LITERATURA

Alvarez-Alvarez M., Galdos L., Fernandez-Martinez M., Gomez-Busto F., Garcia-Centeno V., Arias-Arias C., Sanchez-Salazar C., Rodriguez-Martinez A.B., Zarranz J.J., Pancorbo M.M. (2003): 5-Hydroxytryptamine 6 receptor (5-HT₆) receptor and apolipoprotein E (ApoE) polymorphisms in patients with Alzheimer's disease in the Basque Country. *Neuroscience Letters* **339**:85-87

Alzheimer's Association (2015): Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia* 2015, **11**: 1-88

American Psychiatric Association (2000): Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th edition). Washington, DC: American Psychiatric Association

Barnes D.E., Yaffe K. (2011): The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *The Lancet Neurology* **10**: 819-828

Bogaerts V., Engelborghs S., Kumar-Singh S., Goossens D., Pickut B., van der Zee J., Sleegers K., Peeters K., Martin J.J., Del-Favero J., Gasser T., Dickson D.W., Wszolek Z.K., De Deyn P.P. Theuns J., Van Broeckhoven C. (2007): A novel locus for dementia with Lewy bodies: a clinically and genetically heterogeneous disorder. *Brain* **130**: 2277-2291

Bourson A., Borroni E., Austin R.H., Monsma F.J., Sleight A.J. (1995): Determination of the role of the 5-HT₆ receptor in the brain: a study using antisense oligonucleotides. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* **274**:173-180

Cirrito J.R., Disabato B.M., Restivo J.L., Verges D.K., Goebel W.D., Sathyan A., Hayreh D., D'Angelo G., Benzinger T., Yoon H., Kim J., Morris J.C., Mintun M.A., Sheline Y.I. (2011): Serotonin signaling is associated with lower amyloid- β levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:14968-14973

Cockrell J.R., Folstein M.F. (1988): Mini-Mental state examination. *Psychopharmacology bulletin* **24**:689-692

Cunningham E.L., McGuinness B., Herron B., Passmore A.P. (2015): Dementia. *Ulster Medical Journal* **84**: 79-87

Dawson L.A., Nguyen H.Q., Li P. (2001): The 5-HT₆ receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **25**:662-668.

Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R. (1975): „Mini-mental state“. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research* **12**:189-198

Garcia-Alloza M., Hirst W.D., Chen C.P., Lasheras B., Francis P.T., Ramirez M.J. (2004): Differential involvement of 5-HT (1B/1D) and 5-HT₆ receptors in cognitive and non-cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* **29**:410-416

Gauthier S., Reisberg B., Zaudig M., Petersen R.C., Ritchie K., Broich K., Belleville S., Brodaty H., Bennet D., Chertkow H., Cummings J.L., de Leon M., Feldman H., Ganguli M., Hampel H., Scheltens P., Tierney M., Whitehouse P., Winblad B. (2006): Mild cognitive impairment. *Lancet* **367**:1262-1270

Gérard C., Martres M.P., Lefevre K., Miquel M.C., Verge D., Lanfumey L., Doucet E., Hamon M., El Mestikawy S. (1997): Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Research* **746**:207-219.

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 7276-7280

Hoyer D., Pazos A., Probst A., Palacios J.M. (1986): Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1A} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites. *Brain research* **376**:85-96

Hoyer D., Pazos A., Probst A., Palacios J.M. (1986): Serotonin receptors in the human brain. II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1C} and 5-HT₂ recognition sites. *Brain research* **376**:97-107

Hoyer D., Martin G. (1997): 5-HT Receptor classification and nomenclature: Towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* **36**:419-428

Huang Y., Mucke L. (2012): Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* **148**: 1204-1222

Ihl R., Krause B., Grass-Kapnake B., Haupt M., Mueller-Gaertner H.W. (2000): Psychometric tests and glucose metabolism. *Neurobiology of aging* **21**:31

Jack C.R., Albert M.S., Knopman D.S., McKhann G.M., Sperling R.A., Carrillo M.C., Thies B., Phelps C.H. (2011): Introduction to the recommendations from the National institute on aging – Alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* **7**:257-262

Kan R., Wang B., Zhang C., Yang Z., Ji S., Lu Z., Zheng C., Jin F., Wang L. (2004): Association of the HTR₆ polymorphism C267T with late-onset Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* **372**:27-29

Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempcy R., Reed M.W., Meyer R.B., Hedgpeth J. (2000): 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* **28**:655-661

Lee A.Y. (2011): Vascular dementia, *Chonnam medical journal* **47**: 66-71

The Lund and Manchester groups (1994): Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *Journal of neurology and psychiatry* **57**: 416-418

Lee H., Swanwick G.R., Coen R.F., Lawlor B.A. (1996): Use of the clock drawing task in the diagnosis of mild and very mild Alzheimer's disease. *International psychogeriatrics* **8**:469-476

Liu H., Hong C., Liu C., Lin K., Tsai S., Liu T., Chi C., Wang P. (2001): Association analysis of the 5-HT₆ receptor polymorphism C267T with depression in patients with Alzheimer's disease. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* **55**:427-429

Lorke D.E., Lu G., Cho E., Yew D.T. (2006): Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. *BMC Neuroscience* **7**:36

Marcos B., Gil-Bea F.J., Hirst W.D, García-Alloza M., Ramírez M.J (2006): Lack of localization of 5-HT₆ receptors on cholinergic neurons: implication of multiple neurotransmitter systems in 5-HT₆ receptor-mediated acetylcholine release. *European Journal of Neuroscience* **24**:1299-1306.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* **34**:939-944

Meneses A. (1998): Physiological, pathophysiological and therapeutic Roles of 5-HT systems in learning and memory. *Reviews in the Neurosciences* **9**:275-289

Meneses A. (1999): 5-HT system and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **23**:1111-1125

Meneses A. (2001): Effects of the 5-HT₆ receptor antagonist Ro 04-6790 on learning consolidation. *Behavioural brain research* **118**:107-110

Minati L., Edginton T., Bruzzone M.G., Giaccone G. (2009): Current concepts in Alzheimer's disease: A multidisciplinary review. *American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias* **24**: 95-121

McKeith I., Mintzer J., Aarsland D., Burn D., Chiu H., Cohen-Mansfield J., Dickson D., Dubois B., Duda J.E., Feldman H., Gauthier S., Halliday G., Lawlor B., Lippa C., Lopez O.L., Machado J.C., O'Brien J., Playfer J., Reid W. (2004): Dementia with Lewy bodies. *The Lancet Neurology* **3**:19-28

McKeith I.G. (2002): Dementia with Lewy bodies, *British journal of psychiatry* **180**: 144-147
World health organization (March 2015): Dementia Fact Sheet N°362,

McKhann G.M., Albert M.S., Grossman M., Miller B., Dickson D., Trojanowski J.Q. (2001): Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia. *Archives of Neurology* **58**: 1803-1809

Meltzer C.C., Smith G., DeKosky S.T., Pollock B.G., Mathis C.A., Moore R.Y., Kupfer D.J., Reynolds C.F. (1998): Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: The emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology* **18**:407-430
Querfurth H.W., LaFerla F.M. (2010): Mechanisms of disease, Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* **362**: 329-344

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**: 1215

National institute on aging (2014): Frontotemporal disorders. Information for patients, families and caregivers.

Orlacchio A., Kawarai T., Paciotti E., Stefani A., Orlacchio A., Sorbi S., St George-Hyslop P.H., Bernardi G. (2002): Association study of the 5-hydroxytryptamine(6) receptor gene in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* **325**:6-13

Palmer A.M., Middlemiss D.N., Bowen D.M. (1987): [³H]8-OH-DPAT binding in Alzheimer's disease: An index of pyramidal cell loss? U: Dourish C., Ahlenius A., Hutson P. (ur.), *Brain 5-HT1A receptors*. Chichester, Ellis Horwood Ltd, str. 286-299

Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri C.P. (2013): The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* **9**:63-75

Querfurth H.W., LaFerla F.M. (2010): Mechanisms of disease, Alzheimer's disease. The New England Journal of Medicine **362**: 329-344

Ramirez M.J. (2013): 5-HT₆ receptors and Alzheimer's disease. Alzheimer's Research & Therapy **5**: 15

Ramirez M.J., Lai M.K.P., Tordera R.M., Francis P.T. (2014): Serotonergic therapies for cognitive symptoms in Alzheimer's disease: Rationale and current status. Drugs **74**:729-736

Riemer C., Borroni E, Levet-Trafi t B, Martin J.R., Poli S., Porter R.H, Bös M. (2003):

Infl uence of the 5-HT₆ receptor on acetylcholine release in the cortex: pharmacological characterization of 4-(2-bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a potent and selective 5-HT₆ receptor antagonist. Journal of Medical Chemistry **46**:1273-1276.

Rosen W.G., Mohs R.C., Davis K.L. (1984): A new rating scale for Alzheimer's disease. American journal of psychiatry **141**:1356-1364

Roth B., Hanizavareh S.M., Blum A.E. (2004): Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. Psychopharmacology **174**:17-24

Schechter L.E., Lin Q., Smith D.L., Zhang G., Shan Q., Platt B., Brandt M.R., Dawson L.A., Cole D., Bernotas R., Robichaud A., Rosenzweig-Lipson S., Beyer C.E. (2008): Neuropharmacological profile of novel and selective 5-HT₆ receptor agonists: WAY-181187 and WAY-208466. Neuropsychopharmacology **33**:1323-1335.

Shinkai T., Ohmori O., Kojima H., Terao T., Suzuki T., Abe K. (1999): Association study of the 5-HT₆ receptor gene in schizophrenia. American journal of medical genetics (Neuropsychiatric genetics) **88**:120-122

Sunderland T., Hill J.L., Mellow A.M., Lawlor B.A., Gundersheimer J., Newhouse P.A., Grafman J.H. (1989): Clock drawing in Alzheimer's disease. A novel measure of dementia severity. Journal of the American geriatrics society **37**:725-729

Thome J., Retz W., Baader M., Pesold B., Hu M., Cowen M., Durany N., Adler G., Henn F.A., Rosler M. (2001): Association analysis of HTR6 and HTR2A polymorphism in sporadic Alzheimer's disease. Journal of Neural Transmission **108**:1175-1180

Trillo L., Das D., Hsieh W., Medina B., Moghadam S., Lin B., Dang V., Sanchez M.M., De Miguel Z., Ashford J.W., Salehi A. (2013): Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. Translating basic science into clinical care. Neuroscience and Biobehavioral Reviews **37**:1363-1379

Tsai S., Liu H., Liu T., Wang Y., Hong C. (1999): Association analysis of the 5-HT₆ receptor polymorphism C267T in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters **276**:138-139

Upton N., Chuang T.T., Hunter A.J., Virley D.J. (2008): 5-HT₆ receptor antagonist as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease. Neurotherapeutics **5**:458-469

West P.J., Marcy V.R., Marino M.J., Schaff hauser H. (2009): Activation of the 5-HT(6) receptor attenuates long-term potentiation and facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. Neuroscience **164**:692-701.

Weyer G., Erzigkeit H., Kanowski S., Ihl R., Hadler D. (1997): Alzheimer's disease assessment scale: Reliability and validity in a multicenter clinical trial. *International psychogeriatrics* **9**:123-138

World Health Organization (March 2015): Dementia Fact sheet N°362,

Xu Y., Yan J., Zhou P., Li J., Gao H., Xia Y., Wang Q. (2012): Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* **97**:1-13

Xu Z., Zhang Z., Shi Y., Pu M., Yuan Y., Zhang X., Li L., Reynolds G.P. (2012): Influence and interaction of genetic polymorphisms in the serotonin system and life stress on antidepressant drug response. *Journal of Psychopharmacology* **26**:349-359

Yu Y.W., Tsai S.J., Lin C.H., Hsu C.P., Yang K.H., Hong C.J. (1999): Serotonin-6 receptor variant (C267T) and clinical response to clozapine. *NeuroReport* **10**:1231-1233

Zaccai J., McCracken C., Brayne C. (2005): A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies. *Age and Ageing* **34**: 561-566

8. ŽIVOTOPIS

PREZIME: Nikolić
IME: Barbara
DATUM ROĐENJA: 07.12.1991.
E-MAIL: barbaranikolic@ymail.com

OBRAZOVANJE:

2013 - diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija
na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu
2010 - 2013 preddiplomski studij biologije na Odjelu za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku
2006 - 2010 III. gimnazija Osijek

RADNO ISKUSTVO:

01.09.2015. – 30.11.2015. laboratorijski praktikant na Institutu Max Planck,
Goettingen, Njemačka
01.12.2014. – 30.06.2015. studentski posao asistenta u farmakovigilanciji,
Ewopharma d.o.o., Zagreb

INFORMATIČKO ZNANJE: Microsoft office

JEZICI: Engleski (B2), Španjolski (A)